

Université de Neuchâtel

Faculté des Sciences

**IMMOBILISATION DE LA
GLUCOSE-DÉSHYDROGÉNASE
CARACTÉRISATION & APPLICATIONS**

Thèse présentée à la faculté des sciences par

Emmanuel BISSÉ

Ingénieur chimiste diplômé

de l'université de Neuchâtel

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

*laboratoire de
chimie clinique
hôpital cantonal
de Bâle*

Mai 1980

Université de Neuchâtel

Faculté des Sciences

**IMMOBILISATION DE LA
GLUCOSE-DÉSHYDROGÉNASE
CARACTÉRISATION & APPLICATIONS**

Thèse présentée à la faculté des sciences par

Emmanuel BISSÉ

Ingénieur chimiste diplômé

de l'université de Neuchâtel

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

*laboratoire de
chimie clinique
hôpital cantonal
de Bâle*

Mai 1980

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Immobilisation de la glucose déshydrogénase.

Caractérisation et application.

de Monsieur Emmanuel Bissé

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs D. Vonderschmitt,

E. Stutz et P. Métais (Strasbourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 20 juin 1980

Le doyen:



K. Bernauer
K. Bernauer

à mon feu Père

à mon feu Frère Bissé Dagobert



à mon Ami Walter Oetterli

à ma Mère

à Nicole Golay



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555006_0009

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
1. INTRODUCTION	
1.1. Aperçu historique	4
1.2. Modes d'immobilisation	5
1.2.1. Chimie d'insolubilisation des enzymes par liaison covalente	6
1.2.2. Types de support	9
1.3 Application des enzymes immobilisées	11
1.3.1. Application en biochimie	11
1.3.2. Application dans la synthèse	11
1.3.3. Application en médecine	12
1.3.4. Application en analyse	13
1.4. Analyse à flux continu	14
1.5. But du travail	22
2. PARTIE EXPERIMENTALE	
2.1. Fixation des enzymes dans les tubes de nylon	23
2.1.1. Immobilisation par l'intermédiaire du glutaraldéhyde	24
2.1.1.1. Préparation de la glucose oxydase (EC 1.1.3.4) et de l'uréase (EC 3.5.1.5)	25
2.1.1.2. Immobilisation de la glucose déshydrogénase (EC 1.1.1.47)	25
2.1.2. Fixation des enzymes dans les tubes de nylon par l'intermédiaire des ponts inorganiques	27

2.2.	Fixation des enzymes sur du verre	31
2.2.1.	Préparation de la Gluc-DH immobilisée sur du verre	32
2.2.1.1.	Immobilisation par l'intermédiaire du TiCl_4	34
2.2.1.2.	Immobilisation par l'intermédiaire du glutaraldéhyde	34
2.2.2.	Conservation des réacteurs	34
2.3.	Détermination des paramètres cinétiques des "OTHER"	36
2.3.1.	Paramètres cinétiques des dérivés de la Gluc-DH	36
2.3.1.1.	Matériel et méthode	36
2.3.1.2.	Détermination de K'_M , $V'_{\max}$ et A_s	37
2.3.1.3.	Détermination du profil de pH	39
2.3.1.4.	Effet de la température	39
2.3.1.5.	Influence de la force ionique	39
2.4.	Applications	
2.4.1.	Détermination des paramètres caractéristiques de la méthode	40
2.4.1.1.	Linéarité et "steady state"	40
2.4.1.2.	Précision	40
2.4.1.3.	Exactitude	40
2.4.1.4.	Contamination (carry-over)	41
2.4.1.5.	Corrélation	41
2.4.2.	Détermination de l'urée par l'uréase immobilisée à l'intérieur des tubes de nylon	42
2.4.2.1.	Principe	42

2.4.2.2.	Matériel	42
2.4.2.3.	Réactifs	44
2.4.3.	Détermination du glucose par la glucose oxydase immobilisée à l'intérieur d'un serpentín de verre	44
2.4.3.1.	Principe	44
2.4.3.2.	Matériel	45
2.4.3.3.	Réactifs	45
2.4.4.	Détermination du glucose par la glucose déshydrogénase immobilisée	48
2.4.4.1.	Principe	48
2.4.4.2.	Matériel	48
2.4.4.3.	Réactifs	48
2.4.4.4.	Détermination du glucose par la glucose déshydrogénase immobilisée, dans le système de flux continu classique (AA II)	50
2.4.4.4.1.	Analyse du glucose (solution aqueuse) à l'aide de la Gluc-DH immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire du glutaraldéhyde (n-Gluc-DH)	50
2.4.4.4.2.	Analyse du glucose dans le sérum par la Gluc-DH immobilisée dans les tubes de nylon où le tétrachlorure de titane sert de pont (n-Gluc-DH-Ti)	51
2.4.4.5.	Technique du SMAC dans la détermination du glucose par la glucose déshydrogénase immobilisée	53
2.4.4.5.1.	Principe de la technique du SMAC dans l'utilisation des IMER	53
2.4.4.5.2.	Test de contrôle du canal (SMAC-IMER)	53
2.4.4.5.3.	Analyse du glucose par la n-Gluc-DH-Ti sur le SMAC	53

2.4.4.5.4.	Analyse du glucose par la v-Gluc-DH-Ti sur le SMAC	53
3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS	
3.1.	Paramètres cinétiques	57
3.1.1.	Résultats	61
3.1.2.	Discussion	73
3.1.2.1.	Effet du pH sur l'activité	73
3.1.2.2.	Influence de la force ionique I sur K_M	79
3.1.2.3.	Effet thermique	82
3.1.2.3.1.	Profils thermiques des dérivés de la GOD	82
3.1.2.3.2.	Profils thermiques des dérivés de la Gluc-DH	82
3.1.2.4.	Influence du pH dans la fixation des enzymes	86
3.1.2.5.	Influence des silanes dans l'immobi- lisation de la Gluc-DH à l'intérieur des serpentins de verre	89
3.1.2.6.	Réaction du tétrachlorure de titane lors de l'immobilisation des enzymes à l'intérieur des tubes de nylon	91
3.2.	Détermination de l'urée par l'uréase immobilisée dans un tube de nylon	93
3.3.	Analyse du glucose	95
3.3.1.	Analyse du glucose par la v-GOD-Ti	96
3.3.2.	Analyse du glucose en solution aqueuse par la n-Gluc-DH-G	99
3.3.3.	Analyse du glucose dans le sérum par la n-Gluc-DH-Ti	99

3.3.4.	Analyse du glucose dans le sérum par la n-Gluc-DH-Ti sur le SMAC	104
3.3.5.	Analyse du glucose dans le sérum par la v-Gluc-DH-Ti sur le SMAC	109
3.3.6.	Perte d'activité dans les IMER	116
4.	RESUME	119
5.	SUMMARY	121
6.	ABREVIATIONS	123
7.	BIBLIOGRAPHIE	126
	REMERCIEMENTS	

AVANT-PROPOS

La CHIMIE CLINIQUE a été définie par R. Richterich (1) comme "la partie de la médecine qui s'occupe du développement et de l'exécution d'analyses chimiques dans des buts de diagnostic". En tant qu'auxiliaire de la médecine, elle se donne pour tâche d'analyser les échantillons fournis par le médecin de façon RAPIDE, EXACTE et ECONOMIQUE.

Le présent travail s'inscrit bien dans cette définition.

L'impératif de la rapidité implique un choix de méthodes qui évitent des manipulations supplémentaires telles que les séparations. En effet, tout processus de séparation est inévitablement lent et entraîne souvent une diminution d'exactitude et de précision. C'est ainsi que dès l'origine de la chimie clinique les chercheurs ont essayé de déterminer et de doser les substances particulières directement dans le mélange biologique. Ceci demande des réactifs et des réactions d'une haute spécificité, ainsi qu'une haute sélectivité. En général, les réactions purement chimiques ne remplissent pas ces conditions. Cependant, les réactions enzymatiques et immunologiques sont, de par leur nature même, hautement spécifiques et sélectives.

La technologie enzymatique n'est pas un art nouveau. Cependant, la nature des enzymes et les difficultés rencontrées dans leur isolement ont retardé leur utilisation dans la chimie analytique.

Il fallut attendre l'hypothèse de Michaelis et Menten (2) sur les réactions enzymatiques et l'isolement de l'uréase par J.P. Summer (3) pour voir naître la chimie enzymatique

moderne. L'utilisation des enzymes à des fins analytiques a été largement étendue grâce aux récents progrès de la biochimie, de la chimie bioorganique et de la technologie de production et de purification des enzymes.

A cause de leur spécificité et de leur grand pouvoir catalytique, les enzymes représentent un outil analytique efficace qui permet de catalyser certaines réactions que l'on ne saurait réaliser avec les réactifs chimiques ordinaires. Par ses propriétés, l'analyse enzymatique est d'une importance capitale en chimie clinique où un grand nombre de métabolites et de produits endogènes nécessitent une détermination spécifique pour le diagnostic. Pour cela, dans les laboratoires clinico-chimiques modernes, on cherche à remplacer les méthodes de chimie classique non spécifiques par les méthodes enzymatiques ou immunologiques. Mais l'utilisation des enzymes en analyse de routine pose un certain nombre de problèmes. En effet, pour les analyses dans les laboratoires de chimie clinique, il faut des enzymes stables et de haute pureté. Cependant, les enzymes pures sont peu économiques comparées aux réactifs chimiques ordinaires. L'exactitude et la reproductibilité exigées en chimie clinique sont fonction de la stabilité des réactifs; par contre, certaines enzymes sont peu stables en solution. Il faut parfois des réactifs supplémentaires (second substrat ou coenzyme) pour stabiliser l'enzyme au cours de la réaction. La complexité et la labilité des protéines biologiquement actives entraînent donc des préparations supplémentaires qui augmentent la durée et le coût des analyses, ce qui rend parfois difficile la mise au point d'un système analytique fiable.

A cela s'ajoute le gaspillage d'enzyme dans les méthodes conventionnelles, surtout avec l'introduction de l'automatisation des analyses. La quantité d'enzyme engagée pour

chaque test est jetée sans que sa capacité catalytique soit exploitée au maximum. Il est donc souhaitable en chimie clinique d'avoir, en plus des enzymes stables et pures, des systèmes analytiques simples permettant des analyses économiques. C'est le but de l'application des enzymes immobilisées en analyse clinique.

1. INTRODUCTION

1.1. Aperçu historique

L'insolubilisation des substances biospécifiques est née d'une part des études comparatives entre les biopolymères et les polymères synthétiques et, d'autre part, de la fabrication des macromolécules dans le but de fixer des biocatalyseurs sur une structure polymère.

Historiquement, l'immobilisation des enzymes est une technologie vieille d'un demi-siècle. Les premières fixations (4 - 7) étaient faites par adsorption physique sur des particules solides. C'est ainsi que l'invertase a été immobilisée sur du charbon actif pour la première fois en 1916 par Nelson et Griffin (4). Dès lors, plusieurs immunologistes essayèrent d'appliquer la méthode en vue d'isoler des anticorps (7). Les résultats peu satisfaisants de la méthode d'adsorption poussèrent les chercheurs à imaginer d'autres moyens d'immobilisation. C'est alors qu'apparut dans la méthodologie l'utilisation des polymères et de leurs dérivés (10, 11) sur du poly-(p-amino-styrène) diazoté. Les premiers grands succès dans la technologie d'immobilisation reviennent à A.D. McLaren, C.A. Zittle, Mitz et Katchalski. A.D. McLaren (12) et C.A. Zittle (13) développèrent l'adsorption des enzymes sur des supports inorganiques. Katchalski (14 - 16) améliorait la technique de la fixation par liaisons covalentes sur des copolymères organiques; Mitz (17) se préoccupa de l'immobilisation sur cellulose. Actuellement, on connaît d'innombrables possibilités de supports et de structures artificielles. C'est ainsi qu'ont été utilisés : le sephadex, la sepharose (18), les polymères acryliques (19), le verre dérivé (20) et le nylon (21 - 26), etc.

1.2. Modes d'immobilisation

Si la variété dans les possibilités de supports et de structures artificielles est grande, il en est de même pour le nombre de méthodes d'immobilisation. D'excellents articles et monographies (27 - 31) décrivent plusieurs méthodes d'immobilisation des protéines biologiquement actives. D'une manière générale, les modes d'insolubilisation des enzymes schématisés par la figure 1 se groupent en quatre catégories :

- a) adsorption physique sur des supports solides
- b) inclusion dans le réseau polymère d'un gel
- c) immobilisation par liaison covalente sur un support
- d) réticulation intermoléculaire ("covalent linking") à l'aide d'un agent bifonctionnel adéquat.

Il n'existe pas une technique idéale et universelle d'immobilisation, le choix du support et de la méthode de fixation est dicté par les paramètres du problème et s'opère en fonction de l'expérience.

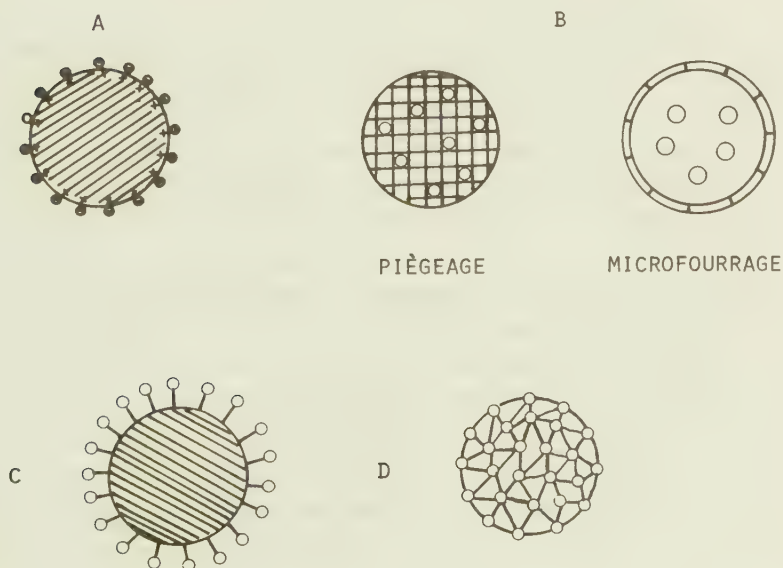


FIG. 1

MODES D'IMMOBILISATION

Néanmoins, la fixation par liaison covalente est la plus utilisée. Elle permet à la fois l'immobilisation d'une quantité suffisante d'enzyme et une fixation permanente. Toutefois, ceci n'est pas une règle générale; la nature chimique du support peut déterminer non seulement la quantité d'enzyme liée, mais aussi le taux de rétention de son activité initiale. De plus, l'activité enzymatique dépend de la technique d'immobilisation. Elle peut être diminuée ou même améliorée par l'insolubilisation.

1.2.1. Chimie d'insolubilisation des enzymes par liaison covalente

La chaîne protéinique porte différents groupes fonctionnels susceptibles de réagir avec d'autres agents chimiques. Il est difficile de prédire exactement le groupe par lequel l'enzyme sera liée et par suite, d'en définir le mécanisme. Cependant, il est important que la protéine ne soit liée au support que par les groupes non essentiels à son activité biologique.

En principe, les groupes fonctionnels de la chaîne protéinique susceptibles de lier l'enzyme au support sont :

- les groupes amino (N-terminal et ϵ -amino de la lysine)
- les groupes carboxyliques (C-terminal, β - et γ -carboxyliques, respectivement des acides aspartique et glutamique)
- le groupe sulfhydryle de la cystéine
- le groupe hydroxyle de la sérine et de la thréonine
- le groupe imidazole de l'histidine
- le groupe phénolique de la tyrosine
- le groupe indole du tryptophane

Une certaine sélection pourrait s'opérer parmi ces groupes par le choix judicieux d'un type de réaction et d'un support dans des conditions douces (pH, température, protec-

tion du site actif par un substrat ou par un inhibiteur spécifique). Pour cela, on utilise un certain nombre de réactions de la chimie organique classique (31) (acylation, arylation, alkylation, diazotation, etc.). En pratique, il est vraisemblable que les groupes amino, carboxyliques ou les noyaux aromatiques de la tyrosine et de l'histidine, soient souvent engagés dans les réactions de fixation par liaison covalente.

La liaison de coordination, cas particulier de la liaison covalente, trouve de nombreuses applications en analyse chimique, chimiothérapie, biologie, dans la synthèse et l'étude des métalloenzymes (32). Cependant, tel n'est pas le cas pour l'immobilisation des enzymes.

Emery et al (33) ont développé une méthode de fixation des enzymes en utilisant certains sels de métaux de transition comme agents de couplage, mais ils ne purent immobiliser des enzymes à l'intérieur des tubes de nylon.

Les groupes fonctionnels de la chaîne protéinique déjà mentionnés sont des centres de coordination. La nature de tels complexes est difficile à élucider. Néanmoins, d'une manière générale, on peut dire que la formation de complexes est déterminée en grande partie par la tendance d'ions métalliques à préférer certains centres de coordination pour former des complexes linéaires ou des chélats. Ainsi, dans le cas des enzymes immobilisées par complexation, la formation de complexe devrait être fonction de la géométrie du métal et être influencée par le pH d'immobilisation. Comme pour les méthodes classiques de fixation, les liaisons électrostatiques et covalentes sont possibles et il n'est pas aisé de déterminer le ou les groupes fonctionnels qui se coordonneront au métal.

La complexation des groupes fonctionnels du site actif (fig. 2) peut se produire et entraîner l'inactivation de l'enzyme. L'interaction enzyme-métal après fixation devrait être différente de celle des métalloenzymes naturelles (32); il en va de même pour le rôle du métal. Un choix judicieux de la concentration du métal, du pH d'immobilisation et une protection éventuelle du site actif limitent l'inactivation de l'enzyme.

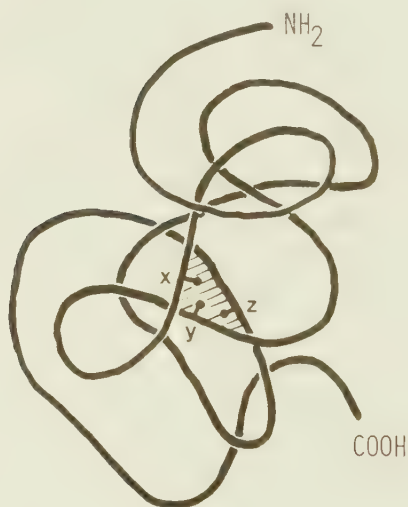
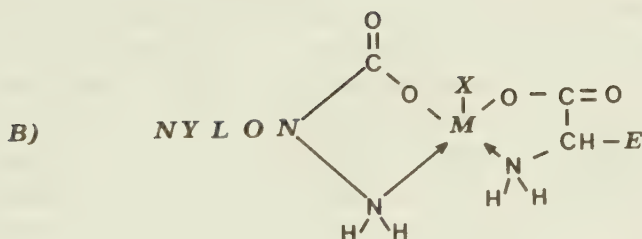
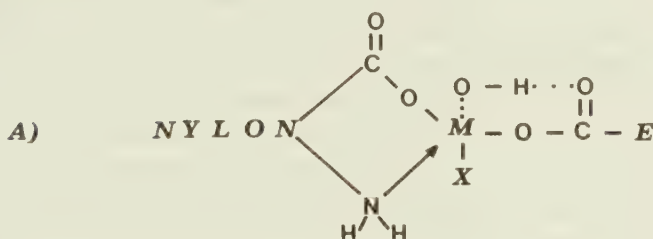


FIG. 2 LE SITE ACTIF (PARTIE HACHURÉE) AVEC SES GROUPES FONCTIONNELS X, Y, Z, RESPONSABLES DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE

Si l'on prend un cas particulier où les groupes amino et carboxyliques constituent les centres de coordination, on peut imaginer que la formation des complexes pourrait se présenter ainsi :



1.2.2. Types de support

Ces dernières années, des enzymes ont été fixées sur des supports de toutes sortes, dont une grande variété existe déjà dans le commerce. Notre propos n'est pas d'en faire l'énumération exhaustive dans ce chapitre.

En général, selon le mode de fixation choisi (ionique ou covalente), la matière solide doit posséder des groupes actifs susceptibles d'entrer en réaction avec l'enzyme. La nature des groupes actifs du support doit être telle

que la réaction enzyme-support puisse se produire dans des conditions douces. L'immobilisation peut se faire par réaction directe du support avec l'enzyme ou par l'intermédiaire des agents de couplage, souvent des molécules polyfonctionnelles (34) (imines, diamines, bialdehydes, bis-imidoesters, etc.). La gamme des réactions utilisées pour activer le support est très large, on peut cependant les classer en 3 catégories :

- 1) les groupes électrophiliques (chlorures d'acide, azoture d'acide, anhydride d'acide, les groupes carbonyles activés par les carbodiimides, etc.);
- 2) les groupes nucléophiliques (amines, groupes sulfhydryles et hydroxyles);
- 3) les sels de diazonium.

Dans le choix du support, il faut tenir compte de certains critères tels que le prix, la stabilité dans les conditions de synthèse et d'utilisation. En rapport avec l'application de l'enzyme immobilisée, doivent être également considérées : la porosité, la densité, la forme, la surface et les dimensions du support.

Dans le cas particulier de notre travail, les tubes de verre et de nylon répondent bien à nos conditions d'immobilisation et d'utilisation. Il nous est possible, lors de l'activation du support, de travailler en solution aqueuse ou organique. La thermostabilité du verre et du nylon permet la conservation du réacteur à basse température (-70°C). Bien que la surface disponible limite la quantité d'enzyme fixée, elle nous permet cependant de minimiser les phénomènes de surface tels que la diffusion. Le fait que l'enzyme soit fixée sur une surface mince permet un contact intime et immédiat entre l'enzyme et le substrat. Le verre et le nylon offrent peu de prise aux attaques microbiennes. Ces deux matières se prêtent à la formation de spirales adaptables au système de flux continu.

1.3. Application des enzymes immobilisées

Primitivement, les dérivés biologiquement actifs devaient servir d'outil pratique pour le biochimiste et l'immunologiste. Avec l'expansion progressive des recherches dans ce domaine, les biocatalyseurs insolubilisés apparaissent comme un nouveau type de système modèle de la biochimie moderne. Ils constituent un nouveau "fer de lance", tant pour la recherche fondamentale que pour la recherche appliquée à la synthèse, la pharmacie, la biochimie, la médecine, l'industrie alimentaire et l'analyse. L'immobilisation des enzymes devient une nouvelle technologie à laquelle contribuent microbiologistes, biochimistes, chimistes et chimistes physiciens.

1.3.1. Application en biochimie

En biochimie, des enzymes immobilisées laissent entrevoir des possibilités dans l'étude des réactions cellulaires (35 - 37) et des mécanismes membranaires (35 - 38, 82, 83, 84); elles sont également utilisées avec profit en chromatographie d'affinité et dans l'étude des interactions moléculaires pour la détermination des structures protéiques (39).

1.3.2. Application dans la synthèse

De nos jours, il est possible de catalyser certaines réactions à l'échelle industrielle dans des réacteurs d'enzymes immobilisées (IMER*). C'est ainsi que l'aminoacylase immobilisée (40 - 44) permet la résolution des mélanges racémiques (D,L) des acides aminés pour la production industrielle des acides L- α -aminés. L'invertase (45 - 47) et la glucoamylase (48, 49) immobilisées sont utilisées pour la production industrielle du glucose à partir du sucrose et de l'amidon soluble. La glucose isomérase est

* IMER = Immobilized Enzyme Reactor

actuellement l'enzyme la plus importante pour les opérations commerciales dans l'industrie alimentaire. Sa forme immobilisée permet de produire du fructose à grande échelle (50 - 53). De même, un IMER de la pénicilline-amidase (54 - 58) permet la synthèse de l'acide amino-6-pénicillanique, produit de départ de plusieurs pénicillines synthétiques. Ceci évite des impuretés ou des sous-produits susceptibles de provoquer des allergies lors des traitements thérapeutiques par la pénicilline. L'acide polyribonucléique, difficile à isoler en réaction chimique, est obtenu à l'aide de la polynucléotide phosphorylase immobilisée (59). Des IMER permettent également de synthétiser l'hydrocortisone, la prednisolone (60) et des trinucléotides (61), bien qu'il soit difficile d'immobiliser les enzymes transformant les stéroïdes. Les protéases immobilisées (62, 63) sont utilisées pour la production du fromage et la purification du lait. Par là, certains problèmes d'hygiène alimentaire sont résolus. C'est ainsi que le lactose (sucre indigeste pour les enfants et certains adultes) peut être éliminé du petit lait par l'utilisation d'un réacteur de lactase immobilisée (64 - 70). Le vin, les jus de fruit et la bière sont purifiés ou clarifiés dans des IMER. A part ces quelques exemples, d'autres enzymes immobilisées ont été signalées dans la littérature (71).

1.3.3. Application en médecine

Un développement se fait dans l'exploration des enzymes immobilisées à des fins thérapeutiques et diagnostiques. Ainsi, la technique d'insolubilisation permet d'isoler des anticorps par immobilisation des antigènes, méthode utilisable en transplantation d'organes pour fixer les anticorps responsables des crises de rejet (72, 73). Des "shunts" extracorporels à enzyme immobilisée ont été développés (74) sur des supports en forme de plaques, de

perles de verre ou de tubes ouverts. L'asparaginase ainsi immobilisée permet de traiter la leucémie (75). De même, la présence d'une enzyme sur une membrane de diffusion peut en potentialiser les qualités (76).

Les utilisations thérapeutiques (77) que suggère la fixation des enzymes exige beaucoup de prudence :

Une bonne conservation des propriétés de l'enzyme est indispensable.

La molécule enzymatique étant protéinique, donc antigénique, peut entraîner des risques anaphylactiques et des réactions antigéniques secondaires.

1.3.4. Application en analyse

Les réacteurs d'enzymes immobilisées constituent un nouveau type de catalyseurs hétérogènes hautement spécifiques et d'un usage pratique pour l'analyse.

Dans la pratique, les IMER se présentent sous forme de :

- membrane (23)
- colonnes (78)
- agitateurs (79, 80)
- tubes ouverts (23, 26)
- électrodes (divers types d'électrodes à enzymes sont déjà opérationnels dans des applications analytiques (81 - 87).

Ces formes permettent la mise au point des systèmes analytiques à flux continu ou discontinu. La substitution de l'enzyme libre se fait alors soit par simple insertion de l'IMER dans un système analytique déjà existant, soit par construction d'autres auxiliaires analytiques à côté de l'IMER.

Diverses méthodes de détection sont utilisées pour la détermination des différents substrats :

- ampérométrie (88, 89)
- photométrie (23, 26)
- conductimétrie (90)
- thermométrie (91)

1.4. Analyse à flux continu

L'emploi de la plupart des réacteurs en analyse est souvent limité par des phénomènes tels que la diffusion et la chute de pression. Bien qu'il n'existe pas de système analytique universel et idéal, la combinaison des réacteurs à tubes ouverts (OTHER*) avec le système de flux continu permet un développement de l'application des enzymes immobilisées en chimie clinique. La substitution de l'enzyme libre s'opère par simple insertion de l'IMER dans un système analytique existant (Technicon AA). On évite ainsi toute mécanique exigée par d'autres techniques. Le fait de pouvoir travailler dans des conditions proches du "steady-state" rend possible le contrôle de la réaction. Ainsi, la vitesse de conversion du substrat, la stabilité et le rendement de l'IMER peuvent être améliorés. En chimie clinique, le flux continu est certainement le seul système qui permet actuellement une utilisation pratique et optimale des "OTHER".

Le système de base comporte trois éléments essentiels : une pompe péristaltique, des hélices (en verre) pour mélanger les solutions réactionnelles et un détecteur (fig. 3).

La pompe péristaltique a pour fonction d'aspirer et de distribuer des quantités déterminées de l'échantillon et des réactifs, puis d'introduire régulièrement des bulles d'air dans le système (fig. 4).

* OTHER = Open Tubular Heterogenous Enzyme Reactor

P: POMPE
R: RÉACTIF
M: MÉLANGEUR (HÉLICE)
D: DIALYSE
SP: PHOTOMÈTRE

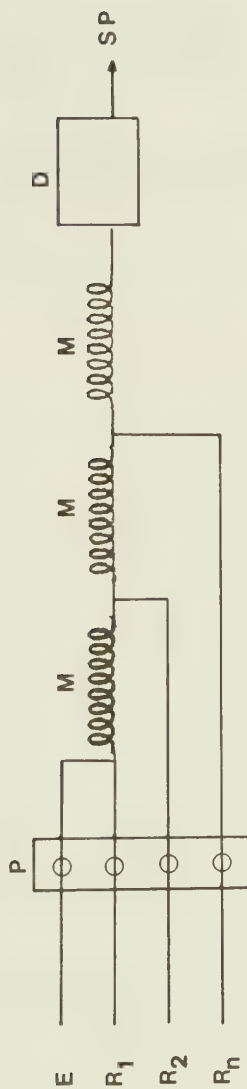


FIG. 3 SYSTÈME DE BASE POUR LE FLUX CONTINU

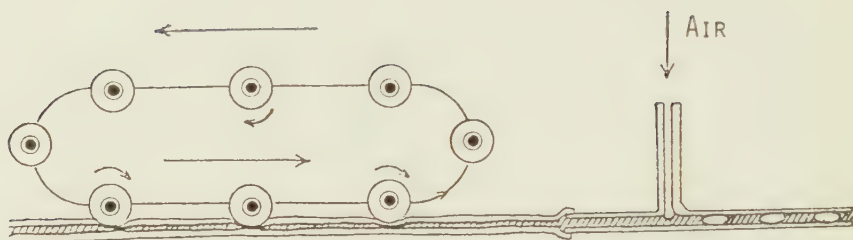


FIG. 4 POMPE PERISTALTIQUE

Les tambours cylindriques de la pompe, entraînés par un moteur à synchrone, tournent à une vitesse constante; le débit désiré peut être atteint par un choix judicieux des tubes. La vitesse du flux peut rester constante pendant une période de un à soixante jours suivant les diamètres des tubes utilisés. La constance de la pompe (92, 93) est telle que sur des courtes périodes, dans un intervalle d'une heure ou d'un jour, les variations sont trop faibles pour être détectées.

Ainsi, le débit de chaque canal (ou tube) reste constant, bien que la valeur absolue de ce débit ne puisse pas être préétablie avec exactitude. En effet, les tubes de différents diamètres ont une tolérance si grande que le débit expérimental varie jusqu'à $\pm 10 \%$ de la valeur nominale calculée à partir du diamètre.

Ceci entraîne la nécessité d'étalonner le système quotidiennement ou à chaque série d'analyse. En admettant que le temps d'aspiration de l'échantillon, t_1 , et que le temps de lavage à l'eau de tube, t_2 , soient en alternance régulière, le détecteur mesure dans le flux une quantité physique (absorbance par exemple) qu'il transforme en signal analogue. Si le flux était absolument idéal, chaque point du front entre échantillon et eau se déplacerait à la même vitesse sans qu'il y ait distorsion par des phénomènes de diffusion ou de turbulence; le signal enregistré aurait alors la forme correspondant à la fig. 5a (les signaux I et II correspondent à l'étalon, IV à VI aux échantillons).

Un flux laminaire normal (fig. 6a) est cependant caractérisé par un gradient de vitesse zéro au voisinage des parois du tube et de vitesse maximale au centre. On obtient ainsi, après un laps de temps, un étalement de l'échantillon sur la presque totalité du tube, et les courbes enregistrées sont fortement déformées (fig. 5b). Pour éviter cette dispersion longitudinale, le flux est segmenté par des bulles d'air de façon à répartir l'échantillon dans plusieurs petits segments. L'addition d'un détergent dans les réactifs facilite le balayage des tubes par les bulles d'air qui ne laissent qu'un petit film de liquide sur les parois. Un transport de matière d'un segment de liquide à l'autre est pratiquement exclu par cette méthode. Les signaux enregistrés après enlèvement des bulles se présentent sous forme de pics nettement séparés (fig. 5c). Le temps d'aspiration t_1 est choisi en fonction de l'établissement d'un "steady state"; au bout de ce temps, le signal doit atteindre au moins les 95 % du plateau de "steady state" (fig. 5d).

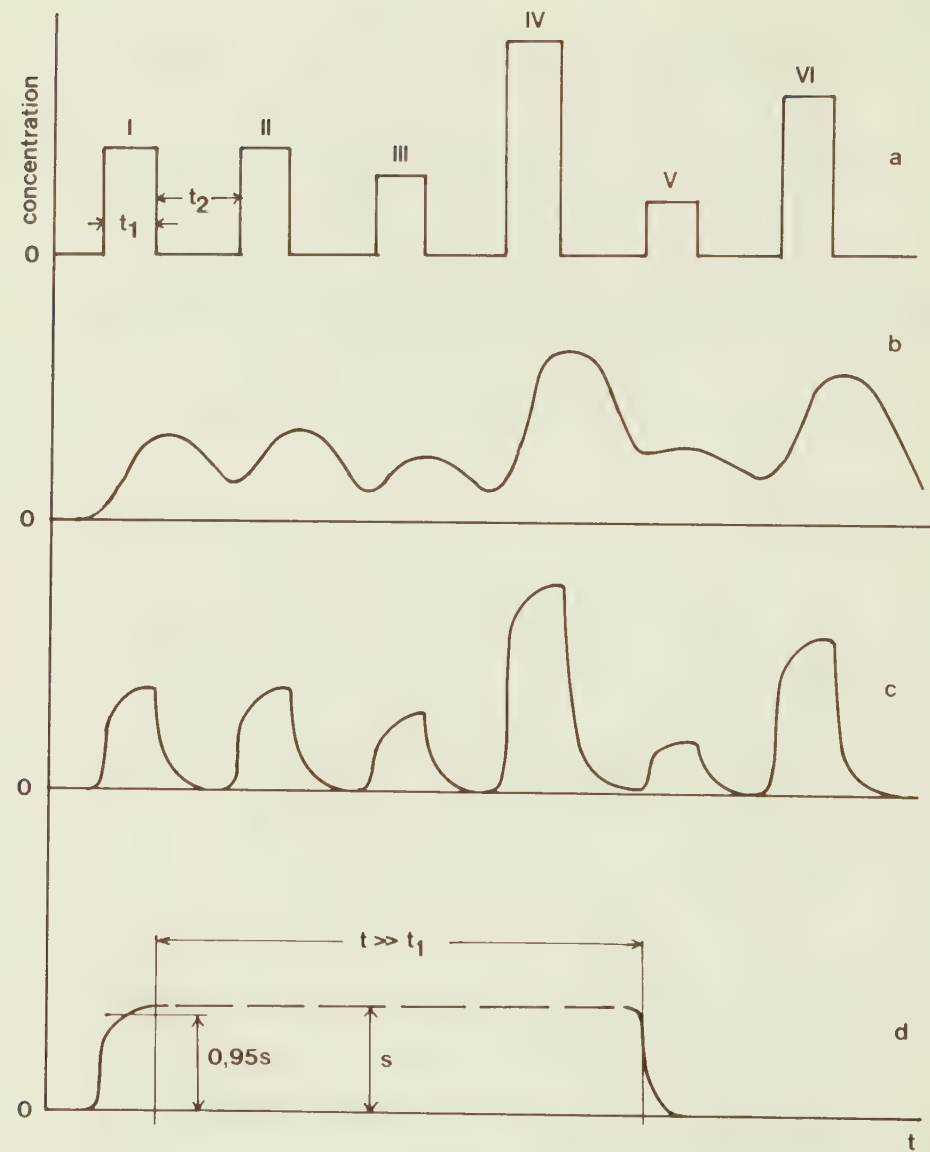


FIG. 5 TYPES DE SIGNAUX D'ENREGISTREMENT EN ANALYSE À FLUX CONTINU

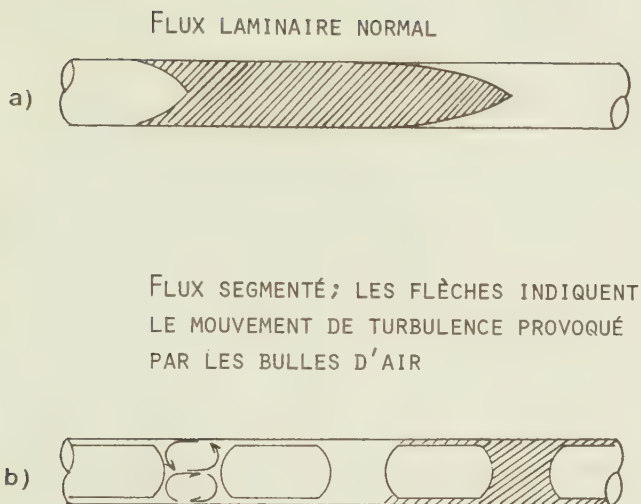


FIG. 6

La segmentation par les bulles d'air élimine un mélange des échantillons successifs et provoque en même temps un mouvement de turbulence dans les tubes (fig. 6b). Les turbulences favorisent un mélange transversal (94, 95) et augmentent la vitesse de diffusion, ce qui, dans notre cas particulier, joue un rôle primordial.

Le succès du système de flux continu est dû en majeure partie au fait que les standards et les échantillons à analyser sont traités de la même manière; ainsi, toute défaillance de l'analyseur affecte dans la même mesure standards et échantillons.

En plus des éléments de base décrits plus haut, il existe un certain nombre d'autres composants qui rendent le système du flux continu extrêmement flexible et pratique : préleveur d'échantillon, dialyse, bain thermostatique et enregistreur.

Cette flexibilité est encore augmentée par l'emploi de différents détecteurs. La détection photométrique est la plus commune, mais elle peut être remplacée par les méthodes de photométrie de flamme, de fluorimétrie ou néphélogétrie, d'électrodes spécifiques aux ions, d'ampérométrie ou même de calorimétrie. La figure 7 montre le schéma d'un dispositif qui permet de mécaniser l'analyse entière du prélèvement au résultat.

Dans les appareils les plus modernes, les bulles d'air introduites pour segmenter le flux ne sont plus enlevées avant le passage du flux dans le détecteur où un système de microprocesseur enregistre le passage d'une bulle d'air et calcule le résultat uniquement quand le détecteur ne contient pas d'air.

Les signaux analogues sont digitalisés et les différents points de la courbe analysés pour signaler immédiatement des défaillances et des irrégularités dans le système. Cette technique couronne l'évolution des appareils de la simple mécanisation à l'automatisation.

B : BAIN THERMOSTATISÉ

P : POMPE

D : DIALYSE

PE: PRÉLEVEUR D'ÉCHANTILLONS

EN: ENREGISTREUR

R : RÉACTIF

I : IMPRIMANTE DIGITALE

SP: PHOTOMÈTRE

M : MÉLANGEUR (HÉLICE)

W : ÉVIER

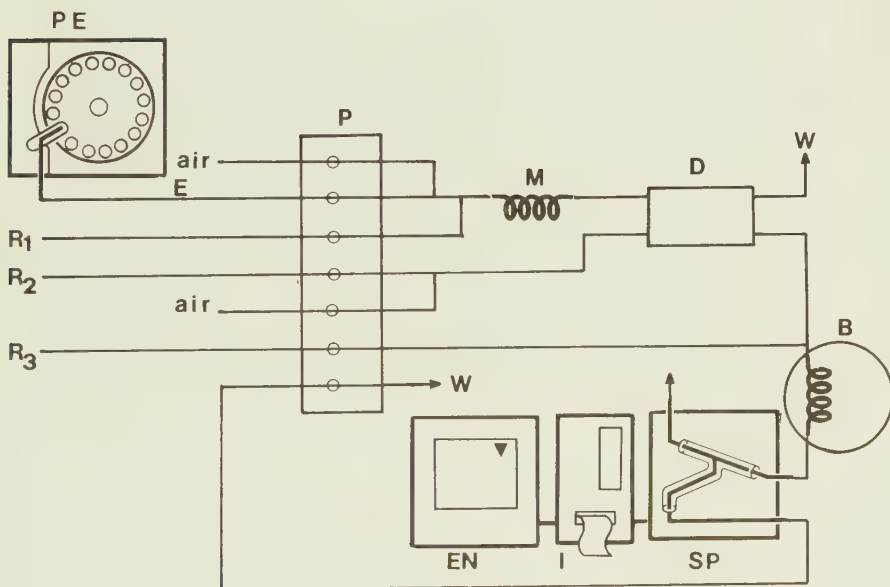


FIG. 7

DIAGRAMME DE FLUX CONTINU
"TECHNICON AA 11"

1.5. But du travail

Déjà esquissé dans l'avant-propos, le but de notre travail est de substituer les analyses enzymatiques conventionnelles par des réacteurs d'enzymes immobilisées (IMER) adaptés au système du flux continu.

Pour cela, nous avons choisi l'uréase, la glucose oxydase et la glucose déshydrogénase (Gluc-DH). La détermination des substrats de ces enzymes représente un grand pourcentage des analyses dans un laboratoire clinico-chimique. Des IMER de la glucose oxydase (GOD) et de l'uréase étaient déjà décrits (23, 87), il a donc fallu améliorer les méthodes et en développer de nouvelles. Par contre, aucune méthode d'immobilisation de la Gluc-DH n'était décrite dans la littérature. La Gluc-DH a une grande spécificité pour le β -D-glucose dont elle catalyse l'oxydation dans une réaction simple, ce qui permet la mise au point d'un système analytique simple. Ainsi, la fixation de la glucose déshydrogénase sur différents supports (tube de nylon et de verre), l'étude cinétique de ces dérivés et leur application dans la détermination du glucose en flux continu constituent le centre d'intérêt de notre travail.

2. PARTIE EXPERIMENTALE

2.1. Fixation des enzymes dans les tubes de nylon

Comme schématisé dans les figures 8 et 9, le principe d'une des méthodes que nous utilisons se résume en trois étapes :

- dépolymérisation partielle du nylon par clivage des liaisons peptidiques (23)
- activation soit des groupes amino, soit des groupes carboxyliques, ou des deux
- fixation de l'enzyme sur le nylon activé.

La dépolymérisation est réalisée à l'aide d'un acide (clivage hydrolytique) ou à l'aide de la N,N-diméthylamino-propyl-amine (clivage non hydrolytique). Le clivage hydrolytique crée des groupes amino et carboxyliques aliphatiques à la surface du nylon, par contre, le clivage non hydrolytique transforme les groupes carboxyliques en amides et ne fait apparaître que les amines primaires.

L'activation se fait avec des substances polyfonctionnelles (imines, diamines, bisaldéhydes) ou avec les sels de métaux de transition (MX_n).

2.1.1. Immobilisation par l'intermédiaire du glutaraldéhyde

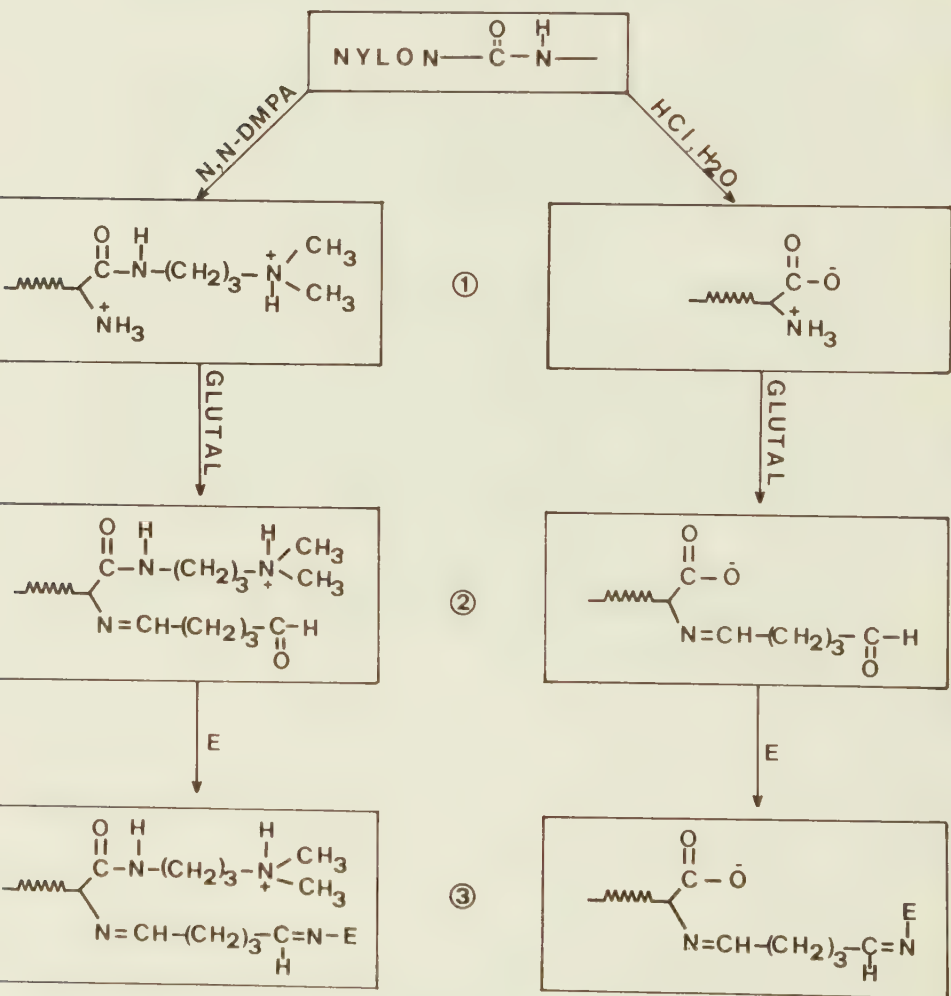


FIG. 8 IMMOBILISATION DANS LES TUBES DE NYLON
ACTIVÉS PAR LE GLUTARALDÉHYDE APRÈS CLI-
VAGE DES LIAISONS PEPTITIQUES DU NYLON

2.1.1.1. Préparation de la glucose oxydase (EC 1.1.3.4) et de l'uréase (EC 3.5.1.5)

Nous avons immobilisé la glucose oxydase et l'uréase dans les tubes de nylon d'après la méthode décrite par Inman et Hornby (23).

2.1.1.2. Immobilisation de la glucose déshydrogénase (EC 1.1.1.47)

Matériel

- tube de nylon 6, longueur 3 m, diamètre intérieur 1,5 mm
- 3-diméthylamino-1-propylamine (Fluka AG)
- glutaraldéhyde (BDH Chemicals Ltd., Poole, Dorset UK)
- glucose déshydrogénase (don de E. Merck, Darmstadt)
- NAD (Boehringer Mannheim)
- NaBH_4 (Fluka AG)
- tampon phosphate (hydrogénophosphate de potassium) 0,12 M, pH 7,6 (tampon d'immobilisation)
- tampon borate 0,1 M, pH 8,5

Méthode

Afin d'augmenter la surface de contact du tube, nous le remplissons d'un mélange composé de CaCl_2 (0,186 g/g) et de 0,186 g/g d'eau dans le méthanol et le laissons pendant 20 minutes dans un bain thermostatisé à 60°C. Le tube est ensuite lavé avec 250 ml d'eau pendant 25 minutes. Le réacteur, rempli de N,N-diméthyl-aminopropylamine, est scellé et mis dans un bain thermostatisé à 70°C pendant 15 h 30 min, puis vidé et lavé avec 600 ml d'eau pendant une heure. Nous faisons passer à travers le tube une solution de glutaraldéhyde 0,125 g/g dans le tampon borate à 1°C pendant 90 minutes en circuit fermé (vitesse de la pompe: 2,5 ml/min). Le tube est alors lavé avec 25 ml de tampon d'immobilisation et utilisé immédiatement pour la fi-

xation de l'enzyme. 20 mg de glucose déshydrogénase sont dissous dans 5 ml de tampon d'immobilisation contenant 3,3 mg de NAD; le mélange est introduit dans le tube et laissé à 4°C pendant 14 h 30 min. Le réacteur est ensuite lavé à 1°C avec 100 ml de tampon phosphate (0,12 M, pH 7,6) contenant 2 mmol de NaBH_4 et, enfin, avec 100 ml de tampon d'immobilisation (vitesse d'écoulement 3,4 ml/min).

2.1.2. Fixation des enzymes dans les tubes de nylon par l'intermédiaire des ponts inorganiques

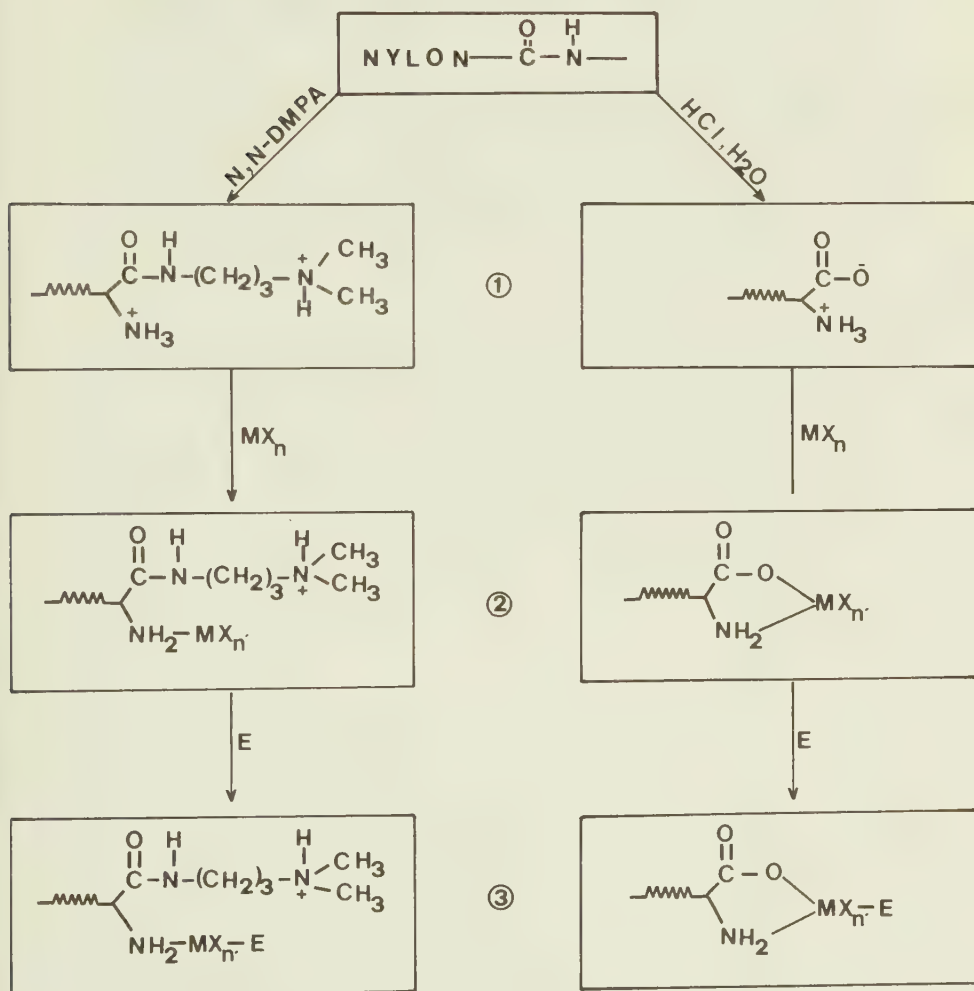


FIG. 9 IMMOBILISATION DANS LES TUBES DE NYLON ACTIVÉS PAR LES SELS DE MÉTAUX DE TRANSITION, MX_n

Les tubes de nylon 6 sont traités avec l'acide chlorhydrique 4 M de la même manière que pour les méthodes classiques (23). L'activation des tubes par les sels de métaux de transition se fait après dépolymérisation partielle du nylon et séchage à 50°C (fig. 10) pendant 2 heures. La solution de sel inorganique (25 ml) (tableau 1) est ensuite pompée à travers le tube (1,69 ml/min). Après séchage à 50°C (2 h), le réacteur est lavé avec 400 ml de tampon d'immobilisation. L'enzyme (10 - 20 mg) est dissoute dans une petite quantité du même tampon (2 - 5 ml) et la solution mise en circuit fermé (1 ml/min) à 4°C pendant 24 h.

Pour la Gluc-DH, l'IMER est lavé avec 100 ml de tampon d'immobilisation (cf. tableau 1) contenant 0,1 M de NaCl, enfin avec 100 ml de citrate de sodium 0,5 M, pH 7,4. Le lavage des réacteurs de la GOD et de l'uréase se fait avec le tampon phosphate 0,1 M, pH 7 contenant 5 μ mol de mercaptoéthanol. Pour de longues périodes, les réacteurs sont conservés à basse température (- 70°C).

Tableau 1

Sels inorganiques utilisés pour l'immobilisation des enzymes dans les tubes de nylon.

sels inor- ganiques	solvant	concen- tration %	enzyme im- mobilisée	tampon M	pH
TiCl ₄	pentane	10 (v/v)	Uréase	phos. 0,1	7
			GOD	" "	"
			Gluc-DH	TRIS 0,05	8
VCl ₄	pentane	5	GOD	phos. 0,1	7
			Gluc-DH	TRIS 0,05	8
MoCl ₅	pentane	10	Uréase	phos. 0,1	7
			GOD	" "	"
			Gluc-DH	TRIS 0,05	8
ZrCl ₄	méthanol	10	Gluc-DH	borate/acé- tate 0,05	9
				TRIS 0,05	8
VCl ₃	méthanol	10	Gluc-DH	TRIS/HCl 0,05	8
FeCl ₃	méthanol	5	Gluc-DH	" "	8
FeCl ₂	méthanol	5	Gluc-DH	" "	8
SnCl ₄	méthanol	10 (v/v)	Gluc-DH	" "	8

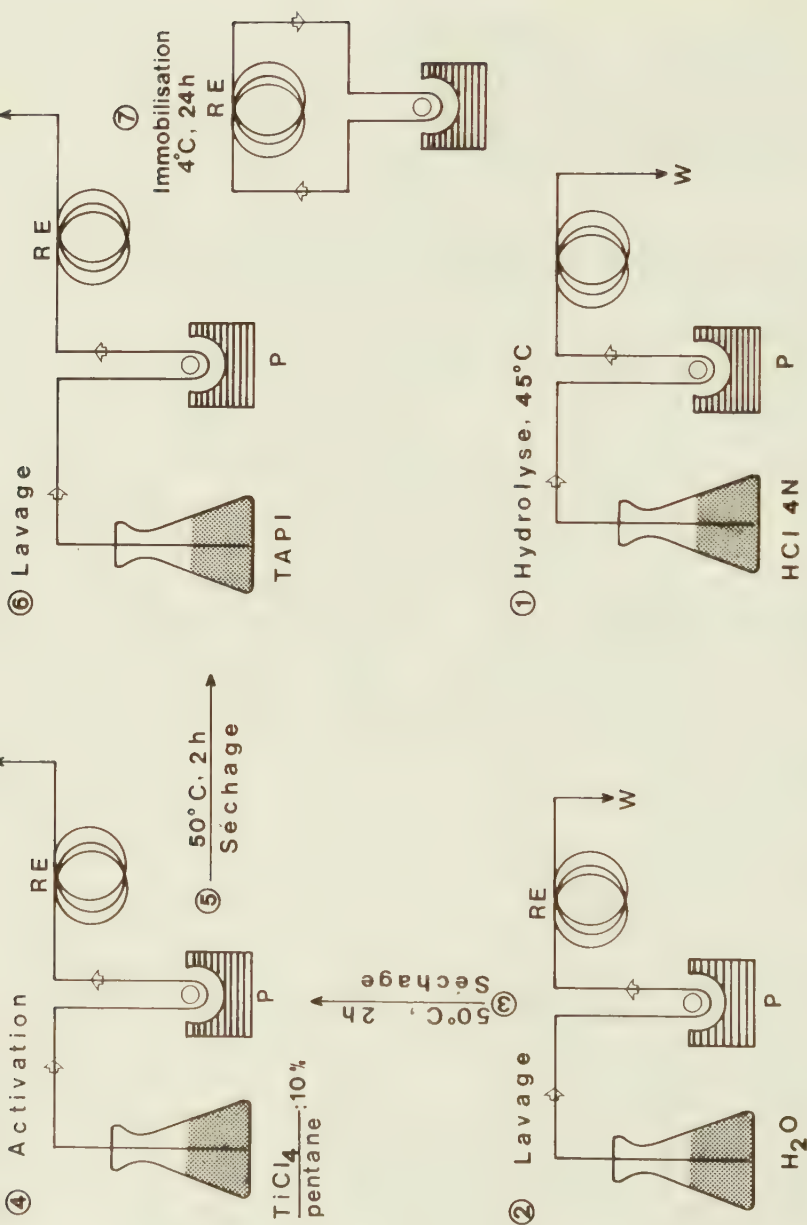
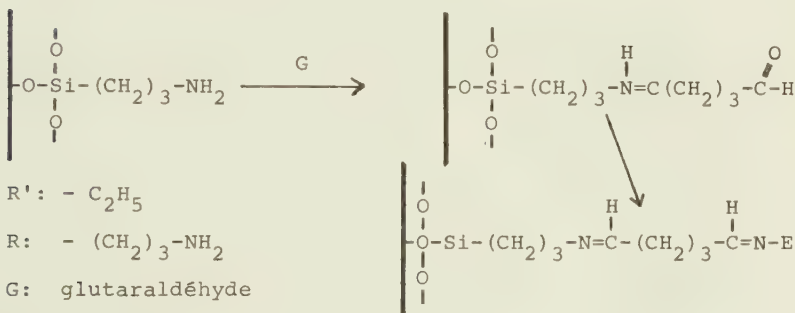
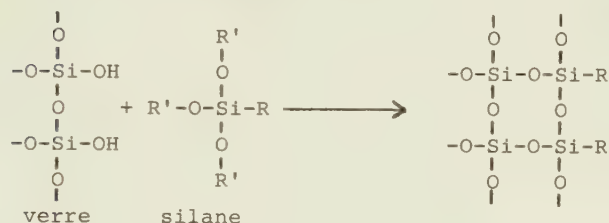


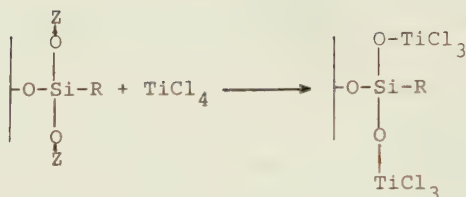
FIG. 10 SCHÉMA DE LA MÉTHODE D'IMMOBILISATION PAR DES PONTS INORGANQUES

2.2. Fixation des Enzymes sur du verre

La silanisation du verre (96) se fait généralement par traitement du verre avec un silane possédant deux à trois groupes hydrolysables Z (Z = alcoxyles) et un groupe fonctionnel R (R = $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2-\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{SH}$, $-\text{CH}_2\text{CN}$). Les silanes réagissent par les groupes hydrolysables avec les groupes silanoles ou oxydes du verre, tandis que le groupe R peut être activé par une molécule bifonctionnelle pour l'immobilisation de l'enzyme (97). La réaction peut être schématisée comme suit :



Nous avons développé une méthode où le verre silanisé est activé par le tétrachlorure de titane (TiCl_4). Dans ce cas, l'activation se fait par la réaction du TiCl_4 avec les groupes hydrolysables disponibles (Z); le groupe R peut alors être un alkyle ou une fonction organique. L'immobilisation de l'enzyme se fait par l'intermédiaire de l'atome de Titane. Nous schématisons la réaction comme suit :



2.2.1. Préparation de la Gluc-DH immobilisée sur du verre

Le serpentín de verre (type Pyrex ou normal) est rempli d'une solution de γ -aminopropyltriéthoxysilane 10 % dans le toluène, fermé à l'aide d'un tube de teflon (fig. 11) et mis au four à 105°C pendant 30 heures. Le tube vidé de son contenu est mis à l'étuve à 115°C pendant 5 heures et ensuite rincé avec du toluène. Le serpentín est séché à 115°C pendant une nuit. Le verre ainsi silanisé se traite de deux manières selon le pont choisi pour l'immobilisation, le glutaraldéhyde ou le tétrachlorure de titane. Le verre silanisé est conservé à 50°C.

La durée de silanisation peut être diminuée suivant les installations à disposition; dans tous les cas, il faut choisir un temps de réaction qui permet le maximum de silanisation, car le rendement en activité après immobilisation en dépend.

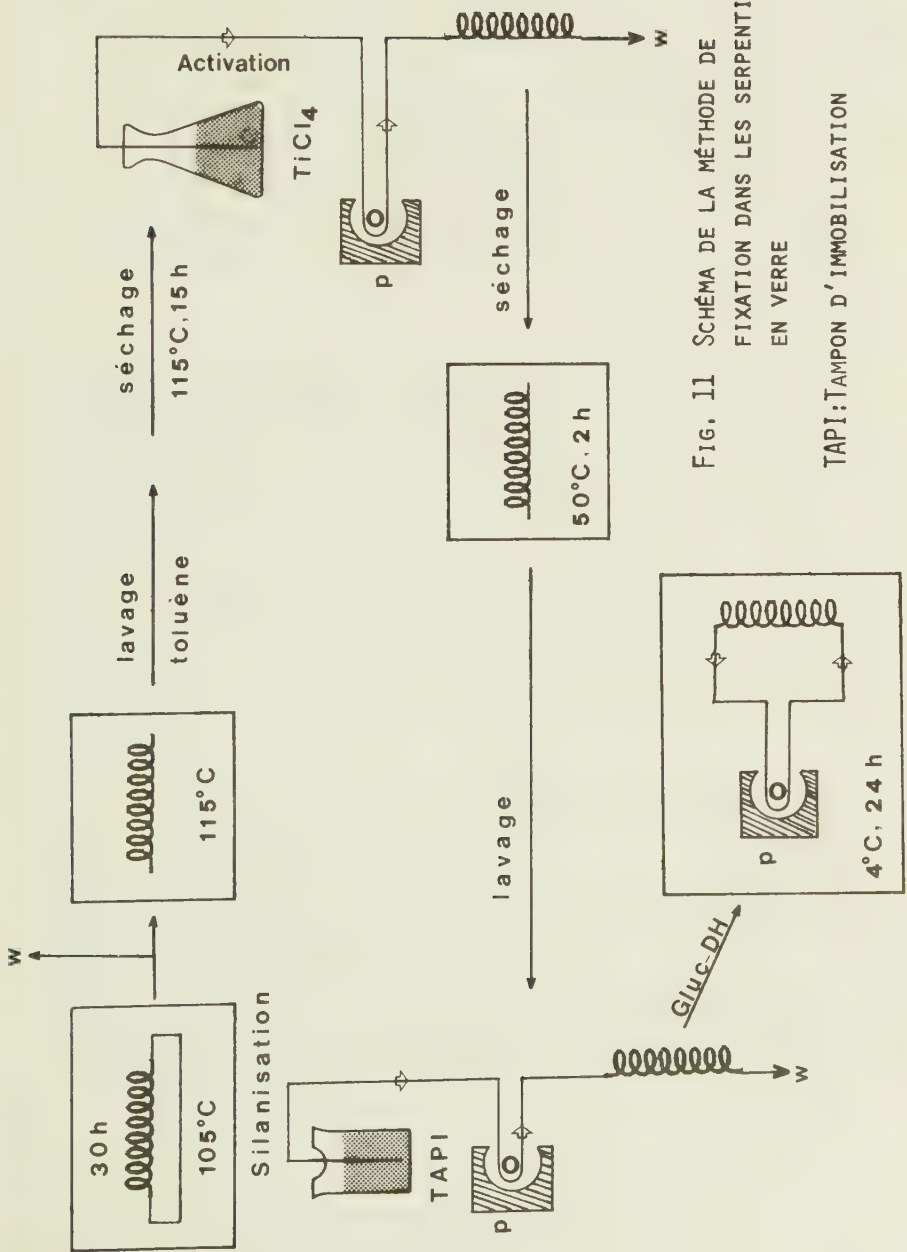


FIG. 11 SCHEMA DE LA METHODE DE
FIXATION DANS LES SERPENTINS
EN VERRE

TAPI: TAMPON D'IMMOBILISATION

2.2.1.1. Immobilisation par l'intermédiaire du TiCl_4

On pompe à travers le tube ainsi silanisé une solution de TiCl_4 10 % dans le pentane pendant 1 heure. Puis, on sèche le serpentín pendant 2 h à 50°C. Le tube est ensuite lavé avec 200 ml de NaCl 0,5 M dans le tampon d'immobilisation (vitesse de lavage 10 ml/min). 20 mg d'enzyme + 3 mg de NAD^+ sont dissous dans 1,5 ml de tampon d'immobilisation et mis dans le tube en circuit fermé à 4°C pendant 24 h (vitesse de la pompe 0,4 ml/min). La solution d'enzyme est récupérée et le tube lavé avec 100 ml de solution NaCl 0,2 M dans le tampon d'immobilisation, puis avec 50 ml de tampon d'immobilisation.

2.2.1.2. Immobilisation par l'intermédiaire du glutaraldéhyde

Le serpentín silanisé est lavé avec 200 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7, puis traité avec une solution de glutaraldéhyde 0,025 g/g dans le tampon phosphate pH 7 à 4°C pendant 2 h (on observe une coloration rosâtre du verre).

Le tube est ensuite lavé avec 200 ml de tampon d'immobilisation (0,12 M KH_2PO_4 , pH 7,6) pendant 20 minutes à 4°C. Enfin, la réaction enzyme-support se fait de la même manière que sous 2.2.1.1. A la fin de la réaction, la coloration du verre devient plus intense (rose).

2.2.2. Conservation des réacteurs

Les réacteurs v-Gluc-DH-Ti sont rincés avec 50 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 contenant 2 mM de NaN_3 et de 1 mM de NAD^+ ensuite conservés vides à basse température pendant une longue période (par ex. une année) sans perte d'activité. Ils sont remplis de la même solution et conservés à 4°C pour l'usage de routine; dans ces conditions, ils peuvent être utilisables pendant 30 jours à raison de 300 échantillons par jour.

Ce mode de conservation s'applique aussi aux dérivés v-Gluc-DH-G. La perte d'activité est en moyenne de 12 % par semaine à 4°C.

L'immobilisation de la GOD et de l'uréase sur du verre se fait de la même manière dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7. Les réacteurs remplis de tampon d'immobilisation contenant 5 μ mol de mercaptoéthanol sont conservés à 4°C.

2.3. Détermination des paramètres cinétiques des "OTHER"

2.3.1. Paramètres cinétiques des dérivés de la Gluc-DH

2.3.1.1. Matériel et méthodes

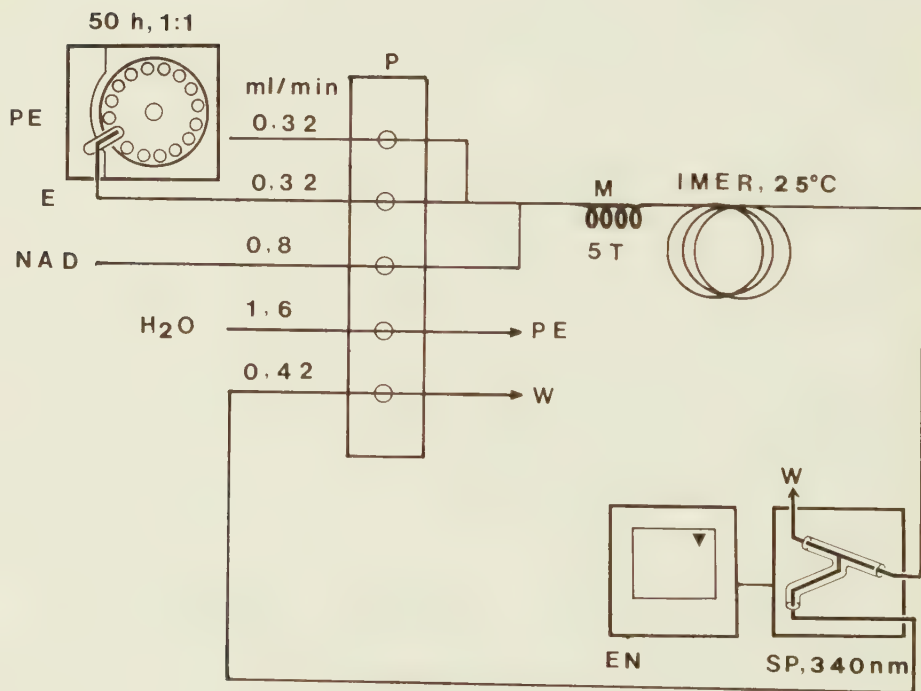


FIG. 12 DIAGRAMME 1 (TECHNICON AA II) POUR LA
DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES

Matériel

- Technicon AA II (fig. 12)
- chronomètre au 1/100 s
- balance E. Mettler type H.16
- conductomètre E-518 Metrohm Herisau
- IMER
- D-Glucose E. Merck Darmstadt
- NADH Boehringer Mannheim
- NAD Boehringer Mannheim

2.3.1.2. Détermination de K_M' , V_{max}' et A_S

Pour déterminer le débit (Q) du système, le liquide est récolté pendant une durée précise (2 à 3 minutes) à la sortie de l'IMER et le volume est déterminé par pesées. Cinq déterminations sont faites avant et après l'expérience; le débit (Q) utilisé dans les calculs est la valeur moyenne des dix déterminations.

La concentration optimum (4,4 mM) du coenzyme (NAD^+) est déterminée en gardant constante la concentration du glucose (27,8 mmol/l) et en variant celle du NAD^+ (fig. 13). Les solutions de NAD^+ sont préparées dans le tampon phosphate 0,1 M au pH optimum de l'enzyme immobilisée.

Les solutions de glucose sont préparées dans l'acide benzoïque 0,1 % et laissées à température ambiante pendant 24 heures avant l'utilisation. Les concentrations du substrat (glucose) sont de 0,833 / 1 / 2 / 2,5 / 3,33 / 4 / 5 / 6 / 8 / 10 et 20 fois le K_M estimé (10^{-2} M). Elles sont multipliées par le facteur de dilution du système pour les calculs.

Toutes les mesures sont faites à 25°C et au pH optimum du dérivé.

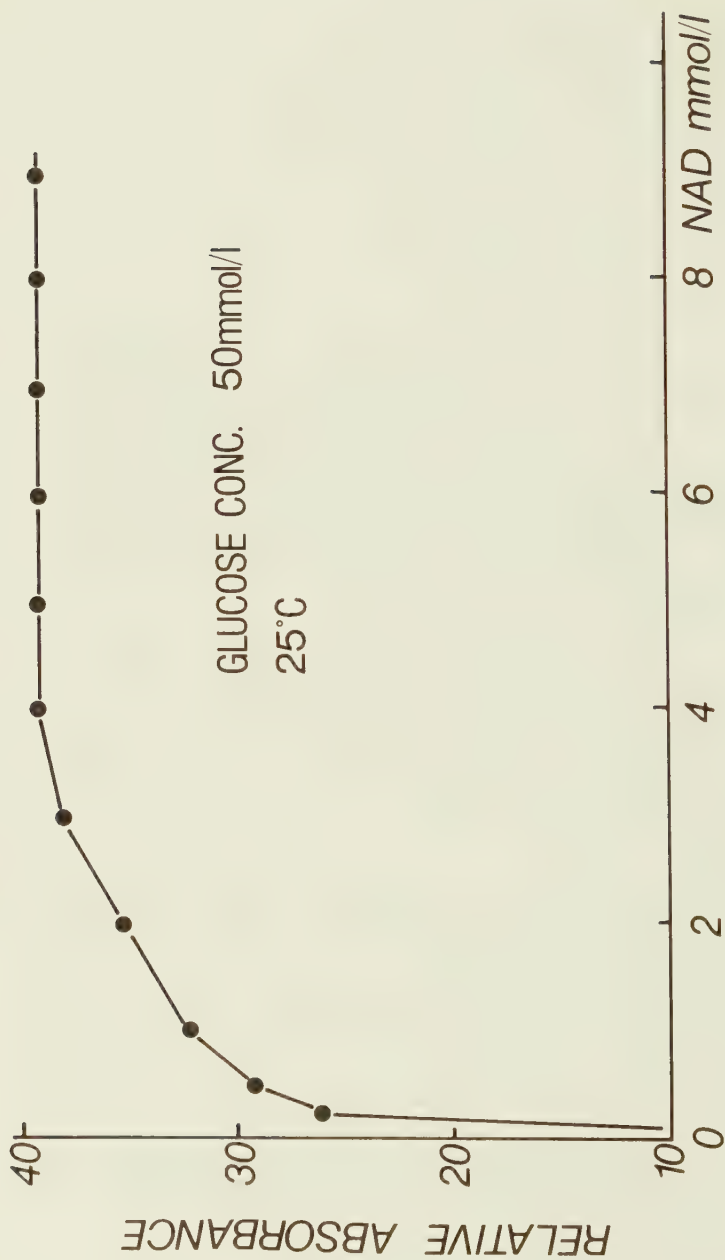


FIG. 13 VARIATION DE L'ACTIVITÉ DES DÉRIVÉS DE LA GLUCOSE DÉSHYDROGÉNASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE NAD^+ .

Avant toute mesure, nous nous assurons que le système est stable; nous disposons les étalons du glucose sur le plateau d'échantillons de manière à avoir un standard de NADH $10^{-3}M$ au début et à la fin de la série. Il est nécessaire d'intercaler l'eau entre les échantillons. La concentration [P] du produit de la réaction est calculée à partir du pic correspondant au standard [NADH].

2.3.1.3. Détermination du profil de pH

L'étude des effets du pH se fait en deux étapes :

- Incubation de l'IMER pendant 25 minutes et mesure de l'activité à différents pH.
- Après l'incubation (25 minutes) à un pH donné, incuber l'IMER (25 minutes) au pH optimum et mesurer l'activité.

2.3.1.4. Effet de la température

L'activité est mesurée après chaque incubation (30 minutes) de l'IMER à une température donnée.

Pour la détermination de l'énergie d'activation, les températures sont choisies entre $20^{\circ}C$ et $37^{\circ}C$ (domaine d'activation réversible de l'enzyme); K_M et V_{max} sont déterminées pour chaque température. La représentation de $\log V_{max}$ en fonction de $1/T$ permet de déterminer l'énergie d'activation (E_a).

2.3.1.5. Influence de la force ionique

Le pH du tampon est fixé au pH optimum de l'enzyme immobilisée; le coenzyme est à la même concentration (4,4 mM) que pour les autres expériences. La variation de la force ionique est faite avec du NaCl (0,05 - 0,4 M), le temps d'incubation fixé à 25 minutes.

2.4. Applications

2.4.1. Détermination des paramètres caractéristiques de la méthode

2.4.1.1. Linéarité et "steady state"

Linéarité.

Pour tous les réacteurs, le test de la linéarité est fait à l'aide de différentes dilutions de sérums de contrôle et de solutions aqueuses de substrat. Les domaines d'étude sont :

0 - 55,5 mmol/l pour le glucose

0 - 16,6 mmol/l pour l'urée

"Steady state"

L'échantillon est aspiré pendant un temps suffisamment long (3 à 5 minutes) pour que le signal correspondant atteigne le plateau "steady state". Le même échantillon est de nouveau aspiré plusieurs fois à la vitesse de l'analyse (50/h par exemple); la hauteur des pics correspondants calculée en fractions par rapport au plateau donne la valeur "steady state" de la méthode.

2.4.1.2. Précision

La détermination de la précision de la méthode est faite par série d'échantillons. Pour cela, N échantillons de même concentration sont analysés successivement. L'analyse est répétée de la même manière de jour en jour pendant une période déterminée (une semaine par exemple). Pour chaque série, la valeur moyenne et la déviation standard sont calculées. Les sérums de contrôle du commerce sont utilisés pour cette étude.

2.4.1.3. Exactitude

Le contrôle de l'exactitude est fait pendant une période

déterminée (jours ou semaines). Ainsi, les sérums de contrôle du commerce sont analysés et les valeurs trouvées comparées aux valeurs de référence; le coefficient de variation (CV) est alors déterminé.

2.4.1.4. Contamination (carry-over)

L'étude de la contamination est faite d'après la méthode décrite par Hjelm (98). On dispose les échantillons en alternant les hautes concentrations (H) avec les faibles concentrations (F) afin de déterminer le coefficient (c) selon la formule :

$$c = \frac{F_1 - F_3}{H_3 - F_3} \quad [1]$$

2.4.1.5. Corrélation

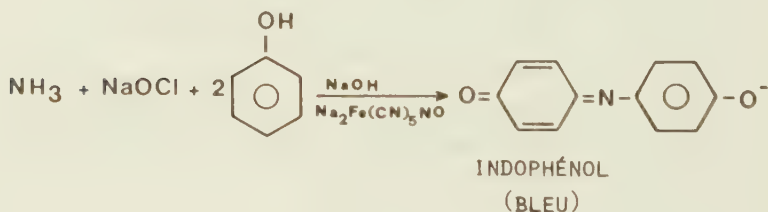
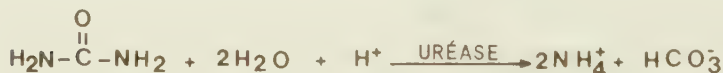
L'étude de la corrélation repose sur la comparaison des résultats obtenus avec la microméthode à la Gluc-DH (99) et ceux que nous obtenons avec la Gluc-DH immobilisée. Parmi les échantillons des patients, on en choisit au hasard un certain nombre de manière à couvrir un large domaine de concentration de glucose. Le temps qui s'écoule entre les deux analyses (IMER et routine) ne doit pas être trop long, afin qu'il n'y ait ni dégradation, ni contamination des échantillons. Le coefficient de corrélation est déterminé par la méthode de régression linéaire et orthogonale.

2.4.2. Détermination de l'urée par l'uréase immobilisée à l'intérieur des tubes de nylon

2.4.2.1. Principe

L'urée est hydrolysée en carbonate d'ammonium par l'uréase. Sous l'action d'une base, le carbonate d'ammonium libère l'ammoniac qui forme un colorant bleu (indophénol) en milieu basique en présence du phénol et de l'hypochlorite de sodium. La réaction est catalysée par le nitroprussiate de sodium et le colorant mesuré à 630 nm.

Equation de la réaction :



2.4.2.2. Matériel

L'équipement Technicon (AA II, fig. 14) a été utilisé pour le système du flux continu, le réacteur d'enzyme immobilisée est préparé selon la méthode déjà décrite (2.1.1.1.).

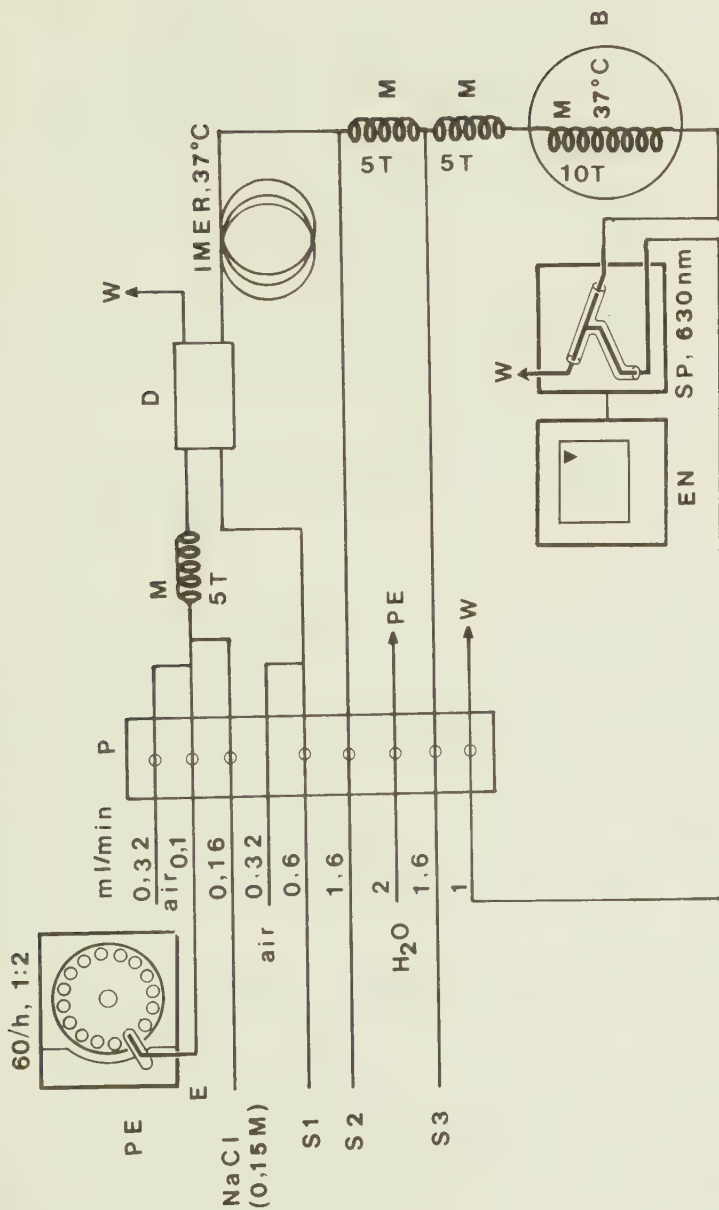


FIG. 14 DIAGRAMME 2 (TECHNICON AA 11) POUR LA DÉTERMINATION DE L'URÉE

2.4.2.3. Réactifs

Solution 1 : Tampon phosphate, pH 7

Dissoudre 13,6 g de dihydrogénophosphate de potassium et 0,3 g d'éthylènediaminetétraacétate (EDTA) dans 800 ml d'eau distillée, puis ajouter 100 µl de mercaptoéthanol. Ajuster le pH à 7 avec une solution d'hydroxyde de sodium 1 N et porter le volume à un litre.

Solution 2 : Hypochlorite de sodium

Mettre 34,4 g d'une solution à 3 % de chlore dans un ballon jaugé d'un litre et amener le volume au trait de jauge avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N

Solution 3 : Solution phénolique

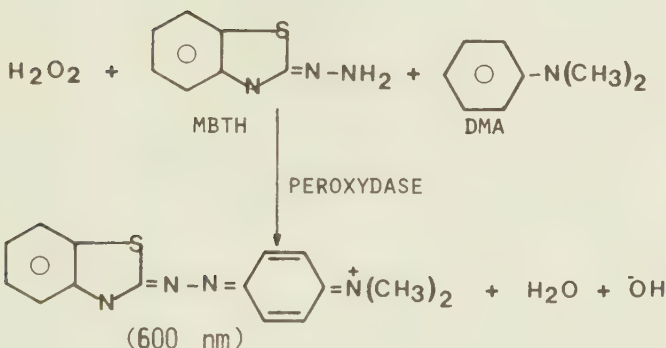
Dissoudre 100 mg de nitroprussiate de sodium et 20 g de phénol dans un litre d'eau distillée.

Comme la méthode est basée sur la mesure de l'ammoniac, l'eau utilisée pour la préparation des réactifs doit être très pure (utiliser l'eau distillée et dégazée; l'eau déminéralisée peut contenir des traces de résine d'échangeurs d'ions qui peuvent gêner la réaction indicatrice).

2.4.3. Détermination du Glucose par la glucose-oxydase immobilisée à l'intérieur d'un serpent en verre

2.4.3.1. Principe

L'oxydation du glucose catalysée par la glucose-oxydase donne l'acide gluconique et de l'eau oxygénée. Comme réaction indicatrice, nous avons utilisé la réaction basée sur le couplage oxydatif de 3-méthyl-2-benzothiazolinonehydrazone (MBTH) avec la diméthylaniline (DMA) en présence de la peroxydase. La concentration du produit formé est proportionnelle à la formation de l'eau oxygénée, donc à la quantité de glucose présente dans l'échantillon (100).



Dissoudre 10 mg de 3-méthyl-2-benzothiazolonehydrazone dans 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N.

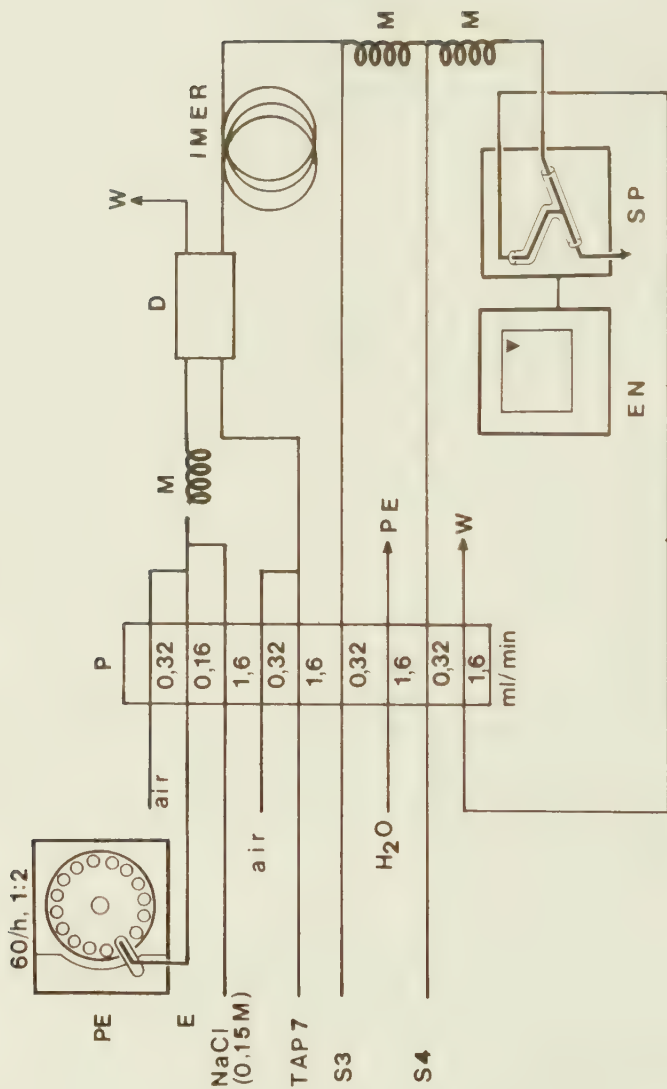


FIG. 15 DIAGRAMME 3. DÉTERMINATION DU GLUCOSE PAR LA
GLUCOSE OXYDASE (IMMOBILISÉE SUR VERRE).

Solution 3 : MBTH-DMA (solution de travail)

Mélanger 2 ml de la solution 2 avec 4 ml de la solution 1 dans un ballon jaugé de 100 ml et amener le volume au trait de jauge avec l'acide acétique 0,5 M.

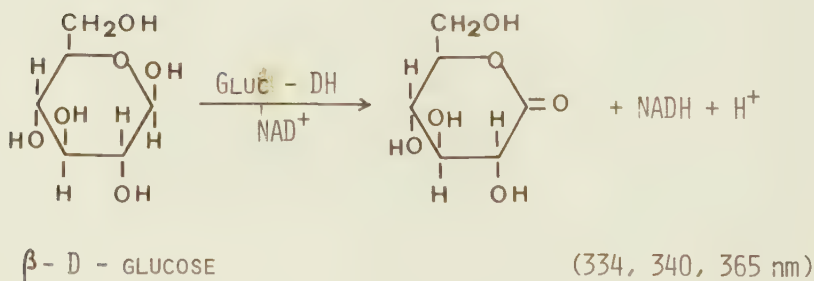
Solution 4 : Dissoudre 40 mg de peroxydase (100 U/mg de protéines; E. Merck) dans un litre de tampon acétate 0,1 M, pH 5.

2.4.4. Détermination du glucose par la glucose-déshydrogénase immobilisée

2.4.4.1. Principe

Sous l'action catalytique de la glucose - déshydrogénase en présence du Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide (NAD), le β -D-glucose est transformé en D-gluconolactone et le coenzyme (NAD) réduit en NADH. Le NADH formé est directement proportionnel à la concentration du glucose dans l'essai. Les mesures sont faites photométriquement à 334, 340 ou 365 nm.

Equations :



2.4.4.2. Matériel

Les réacteurs ont été préparés selon les méthodes déjà décrites. Les appareils Technicon (AA II et SMAC) ont été adaptés à recevoir les réacteurs. Les détails des modifications sont donnés dans les figures 16, 17 et 19.

2.4.4.3. Réactifs

Solution 1 : Chlorure de sodium 0,15 M

Dissoudre 8,8 g de chlorure de sodium et

16,3 g de dihydrogénophosphate de potassium

pour analyse dans 800 ml d'eau distillée, puis ajuster le pH optimum de l'enzyme immobilisée avec une solution d'hydroxyde de sodium 1N. Ajouter à la solution 500 μ l de Pergospense ou de Triton-X-100 (Technicon) et compléter le volume à un litre.

Solution 2 : NAD^+ 4,4 mM

Dissoudre 8,1 g de dihydrogénophosphate de potassium et 1,5 g d'hydroxyde de sodium dans 300 ml d'eau distillée, puis ajouter 1,5 g de NAD^+ . Ajuster le pH au pH optimum du dérivé de l'enzyme. Ajouter 250 μ l de Pergospense ou de Triton-X-100 et, enfin, ramener le volume à 500 ml. Le réactif peut être conservé à 4°C pendant trois semaines.

Solution 3 : Standard de Glucose

Dissoudre 1 g de β -D-Glucose dans 80 ml d'une solution d'acide benzoïque à 0,1 %, compléter le volume à 100 ml avec la même solution d'acide benzoïque et laisser reposer pendant 24 heures.

Préparer les standards de travail par dilution avec la solution d'acide benzoïque 0,1 %.

Sérums standards et de contrôle :

Le sérum standard utilisé est un produit de Technicon. Les sérums de contrôle sont ceux trouvés dans le commerce (Précinorm U, Monitrol I et II, Hyland N et P, Seroquant A).

Echantillons de sérum :

Les échantillons de sérum sont obtenus de notre laboratoire de routine.

2.4.4.4. Détermination du glucose par la glucose-déshydrogénase immobilisée, dans le système de flux continu classique (AA II)

2.4.4.4.1. Analyse du glucose (solution aqueuse) à l'aide de la Gluc-DH immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire du glutaraldéhyde (n-Gluc-DH-G)

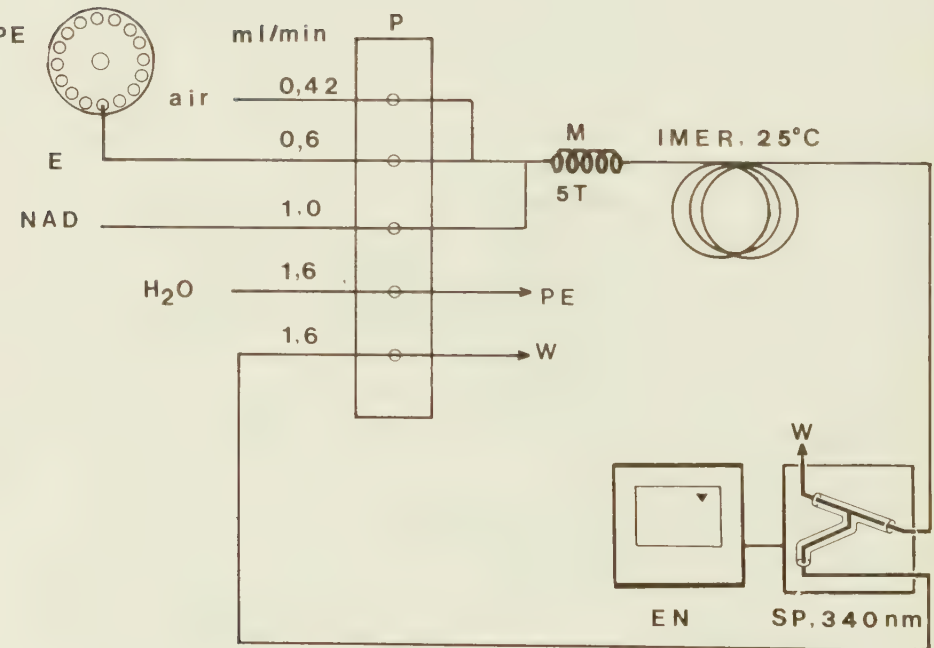


FIG. 16 DIAGRAMME 4. DÉTERMINATION DU GLUCOSE PAR LA n-GLUC-DH-TI

2.4.4.4.2. Analyse du glucose dans le sérum par la Gluc-DH immobilisée dans les tubes de nylon où le tétrachlorure de titane sert de pont (n-Gluc-DH-Ti)

Méthodologie pour Auto-analyseur avec canal à blanc.

Comme le montre le diagramme 2, fig. 17, nous utilisons un système à deux canaux (blanc et test) pour éliminer les interférences des produits endogènes qui absorbent à 340 nm. Pour cela, nous nous assurons, avant toute mesure, que les deux canaux sont en phase; les réactifs sont pompés au travers du système pendant 20 minutes et la ligne de base est ajustée. Les échantillons, le standard, ainsi que les sérums de contrôle sont dilués 1:2. En ajustant le sérum standard, nous déduisons directement les valeurs des échantillons à analyser. La fréquence des analyses est 50/h, le rapport des temps d'aspiration et de lavage est de 1:1.

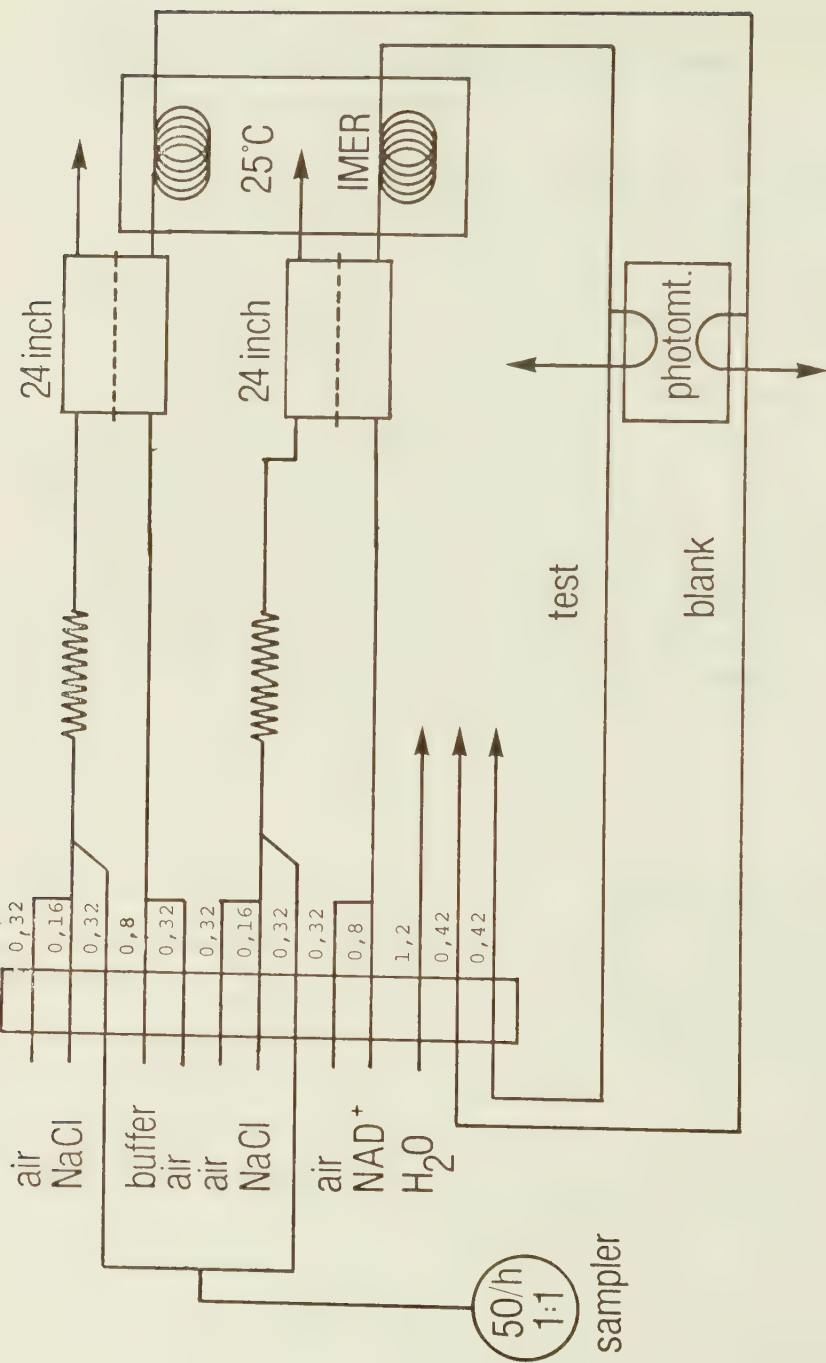


FIG. 17 DIAGRAMME 5, ANALYSE DU GLUCOSE DANS LE SÉRUM AVEC LA GLUCOSE DÉSHYDROGÉNASE (p-GLUC-DH-TT).

2.4.4.5. Technique du SMAC dans la détermination du glucose par la glucose-déshydrogénase immobilisée

2.4.4.5.1. Principe de la technique du SMAC dans l'utilisation des IMER

La technique du SMAC rend possible l'étude cinétique à plusieurs points grâce à la disposition des cuves en séries (fig. 18) et à l'ordinateur incorporé au système. Au cours d'une réaction cinétique, l'ordinateur fait la lecture de la variation d'absorbance entre deux cuves optiques. Ainsi, en insérant l'IMER entre deux cuves (fig. 19), la variation d'extinction enregistrée est proportionnelle à la quantité de substrat transformée dans le réacteur. Ceci évite l'utilisation d'un canal à blanc, comme c'est le cas pour le système du flux continu classique (AA II, fig. 17).

2.4.4.5.2. Test de contrôle du canal (SMAC-IMER)

Ce test donne les informations sur l'état des fibres optiques, la qualité des réactifs et la variation de l'intensité de la lampe (101). Pour cela, pomper l'eau dans le canal et noter la variation d'énergie correspondante pour chaque cuve. Répéter la même opération avec les réactifs. Le contrôle fait pendant une semaine est reporté dans le tableau 2.

2.4.4.5.3. Analyse du glucose par la n-Gluc-DH-Ti sur le SMAC

Le diagramme de flux continu est le même que celui de la figure 19.

2.4.4.5.4. Analyse du glucose par la v-Gluc-DH-Ti sur le SMAC

Le système de flux continu est identique à celui de la figure 19.

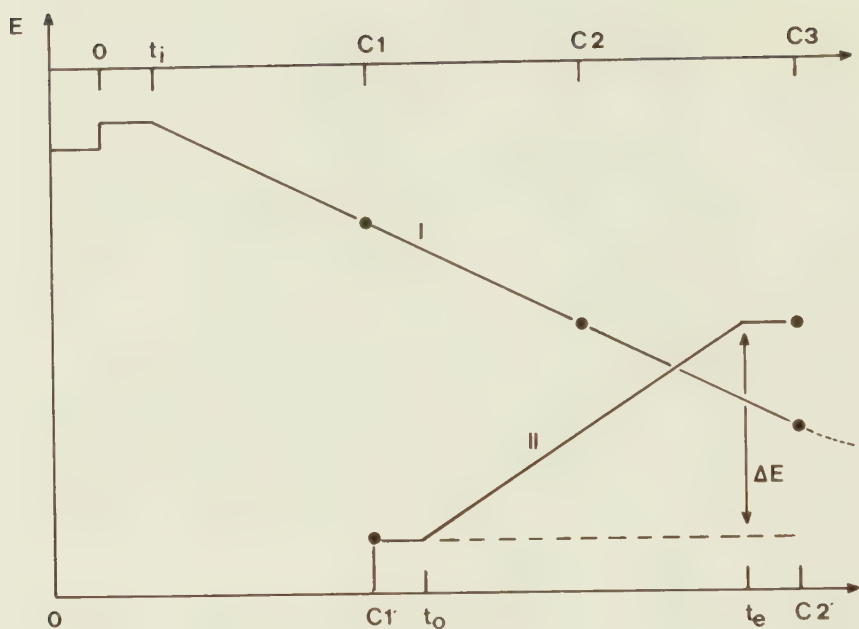


FIG. 18 CINÉTIQUE À PLUSIEURS POINTS DANS LE SMAC

I : ANALYSE DES TRANSAMINASES (ALAT, ASAT)
AVEC OXYDATION DE NADH

II : ANALYSE DU GLUCOSE PAR L'IMER À LA GLUCOSE
DÉSHYDROGÉNASE, RÉDUCTION DE NAD^+ EN NADH

t_i (min): initiation de la réaction (transaminases)

t_0 (min): entrée du mélange réactionnel dans l'IMER
(Gluc-DH)

t_e (min): sortie du mélange réactionnel de l'IMER

C_N, C'_N : cuves optiques

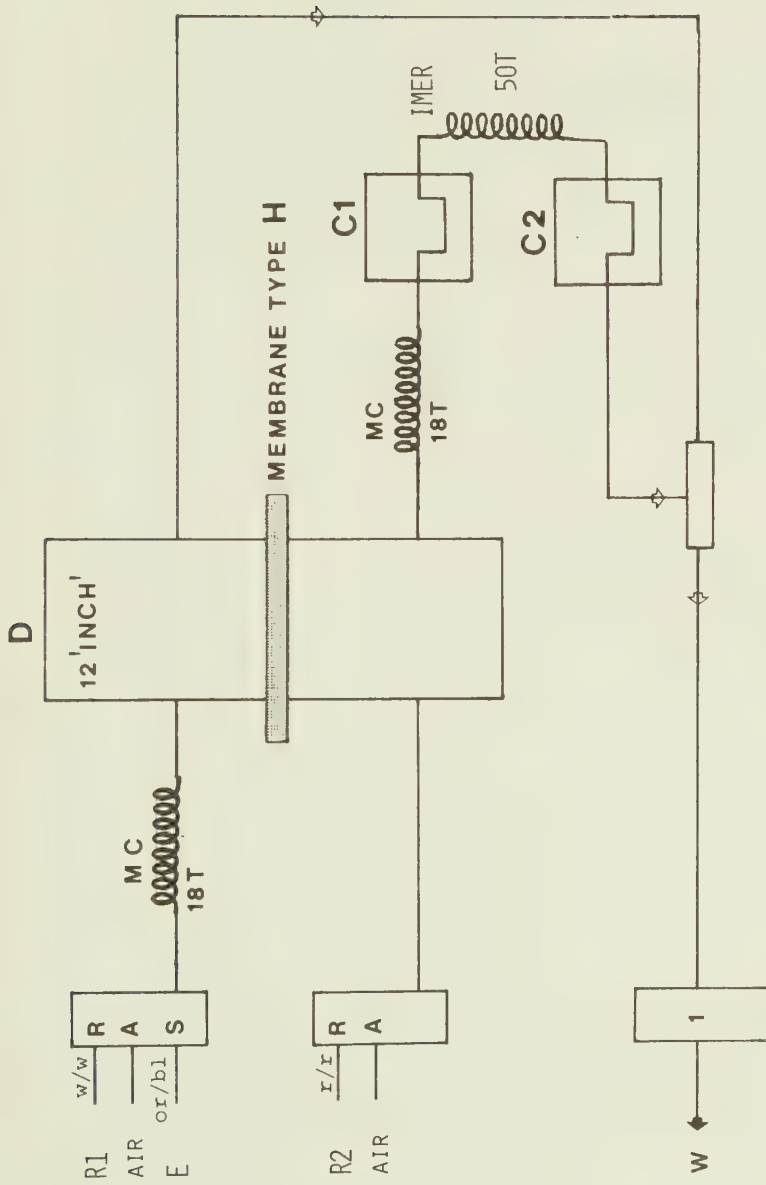


FIG. 19 DIAGRAMME 6 (SMAC). ANALYSE DU GLUCOSE AVEC L'IMER
À LA GLUCOSE DÉSHYDROGÉNASE

Tableau 2

Contrôle du canal (SMAC-IMER, Gluc-DH)

JOUR	ENERGIE/H ₂ O (unité arbitraire)		ENERGIE/REACTIFS (unité arbitraire)	
	C ₁ *	C ₂ *	C ₁	C ₂
1	45	79	19	62
2	46	82	19	63
3	39	76	16	60
7	39	77	12	56
8	40	72	12	54
9	47	74	24	56

*C = cuve optique

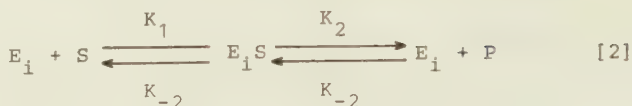
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Paramètres cinétiques

Pour les réactions enzymatiques qui se déroulent à l'intérieur des IMER sous les conditions du flux continu, il existe deux types principaux de cinétiques et leurs hybrides. Dans le premier cas, la réaction est gouvernée par la loi de Michaelis-Menten et la cinétique est décrite par les fonctions mathématiques correspondantes, tandis que le deuxième type de cinétique obéit à la loi de diffusion. La vitesse de réaction est alors limitée soit par la vitesse de diffusion de la solution à la surface, soit par la vitesse de diffusion dans la couche (gel, matrice) contenant l'enzyme. Le comportement cinétique du système dépend de l'IMER d'une part, et des conditions du flux (débit, concentration, segmentation, diamètre du tube, etc.) d'autre part.

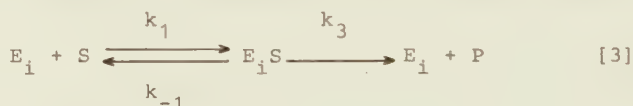
Le type d'IMER dont nous venons de décrire la fabrication présente des groupes enzymatiques à la surface du polymère. Contrairement aux IMER dans lesquelles les enzymes sont fixées sur gel, par réticulation ou copolymérisation, la seule diffusion qui intervient est celle de l'ensemble de la solution (bulk solution) à la surface. Dans un système stationnaire, on devrait alors s'attendre à la formation d'un gradient entre l'ensemble de la solution et la surface, situation qui ressemblerait à celle que l'on trouve à la surface d'électrodes polarographiques. Cependant, le flux continu avec segmentation par des bulles d'air empêche justement la formation d'un tel gradient. Par les turbulences du flux, la vitesse apparente de diffusion est très élevée et n'est pas, en première approximation, limitante pour la réaction globale. C'est pourquoi l'on peut supposer d'emblée que la réaction dans l'IMER peut être représentée par les étapes habituelles formulées par les

réactions enzymatiques en solution :



ou E_i = enzyme immobilisée non complexée
 S = substrat libre
 $E_i S$ = complexe enzyme-substrat
 P = produit formé
 k_1, k_{-1}, k_2 et k_{-2} sont des constantes de vitesse

Lorsque la réaction est étudiée sous des conditions dites conditions initiales ($[S]$ plus grande que la concentration totale de l'enzyme, $[P]$ négligeable) la réaction devient :



La fonction mathématique qui correspond à cette formulation est l'équation de Michaelis-Menten

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = k_3 \cdot \frac{[E_i][S]}{K_M + [S]} \quad [4]$$

K_M , la constante de Michaelis-Menten, est un rapport de constantes de vitesse

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1}$$

Si la concentration du substrat est en large excès devant la concentration de l'enzyme ($[S] \gg K_M$), toute l'enzyme tend à être complexée, v tend vers la vitesse maximum $v_{\max}$ tel que :

$$v_{\max} = k_3 \cdot [E_i] \quad [5]$$

et [4] devient

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad [6]$$

La constante de Michaelis-Menten est égale à la concentration du substrat pour laquelle

$$v = \frac{V_{\max}}{2} \quad [7]$$

Après réarrangement, l'équation [6] devient :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad [8]$$

(représentation de Lineweaver-Burk)

ou

$$v = V_{\max} - K_M \cdot \frac{v}{[S]} \quad [9]$$

(représentation de Augustinsson-Hofstee)

En pratique, ces représentations permettent d'évaluer facilement $V_{\max}$ et K_M à condition que la vitesse initiale v_o soit mesurable pour un nombre de concentrations initiales du substrat $[S]_o$. Or, l'une des propriétés inhérentes au système du flux continu est que la vitesse initiale n'est pas accessible. Dans un tel système, seules la concentration initiale $[S]_o$, la concentration à la sortie de l'IMER, $[S]_e$, et la vitesse moyenne $\bar{v}$ sont connues. C'est pourquoi l'on devrait employer l'équation de Michaelis-Menten [4] sous sa forme intégrée :

$$K_3 [E_i] t = V_{\max} t = - K_M \ln \frac{[S]_e}{[S]_o} + [S]_o - [S]_e \quad [10]$$

Bien qu'il soit facile de transformer [10] en des formes équivalentes aux représentations de Lineweaver-Burk ou de

Hofstee (102), ceci n'est pas nécessaire. On remarquera sans difficulté que les conditions expérimentales permettent de substituer la vitesse moyenne $\bar{v}$ à la vitesse initiale v_0 sans que l'erreur de cette approximation ne dépasse jamais les 2 %. En effet, même pour les IMER les plus actifs, le pourcentage de substrat transformé n'atteint pas 2 % de la concentration initiale de substrat. Par conséquent, le terme

$$\bar{v} = [P] \cdot Q \quad [11]$$

(ou Q est le débit (ml min^{-1}) du flux continu)

a été employé pour toutes les représentations graphiques et les calculs.

Les valeurs de K_M et de $V_{\max}$ des IMER ne sont pas directement comparables à celles des enzymes libres puisqu'il s'agit d'une réaction hétérogène, que la concentration de l'enzyme n'est pas définie et que les facteurs d'influence de ces paramètres sont mal déterminés. Nous représentons, par la suite, ces valeurs comme apparentes : K'_M et $V'_{\max}$.

Pour pouvoir mieux caractériser un certain IMER, nous définissons une activité spécifique du réacteur, A_s , en substituant

$$t = \frac{u}{Q} \quad (\text{min}) \quad [12]$$

(u = volume du réacteur en ml)

$$\text{et} \quad x = \frac{[S]_0 - [S]_e}{[S]_e} \quad [13]$$

(x = facteur de conversion du substrat)

dans l'équation intégrée de Michaelis [10], qui se transforme alors en

$$k_3 E \frac{\phi^2 \pi}{4} l Q^{-1} = x[S]_O - K_M \ln(1-x) \quad [14]$$

ϕ et l sont respectivement le diamètre et la longueur du tube en cm. En mettant (103)

$$k_3 [E] \frac{\phi^2 \pi}{4} = A_S (\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) \quad [15]$$

on obtient la forme

$$A_S \cdot l Q^{-1} = x[S]_O - K'_M \ln(1-x) \quad [16]$$

ou A_S et K'_M peuvent être déterminées en représentant $x[S]_O$ en fonction de $\ln(1-x)$.

3.1.1. Résultats

Les résultats des mesures effectuées et des calculs sont présentés sous forme de tableaux et de graphiques. Les expressions suivantes sont utilisées :

- C_i = concentration de la solution standard de glucose
- F = facteur de dilution dans le système du flux continu ($F = 0,285$)
- $C_i \cdot F$ = S_O concentration initiale du substrat à l'entrée du réacteur
- $[NADH]$ = concentration du NADH à la sortie du réacteur
= $S_O - S_e$
- $x = \frac{S_O - S_e}{S_O} = \frac{[NADH]}{FC_i}$ = facteur de conversion du substrat
- $\bar{v} = [NADH] \cdot Q$ (Q = débit du flux continu)

$\bar{v}$ fonction de S_o , $1/\bar{v}$ fonction de $1/S_o$,
 xS_o fonction de $\ln(1-x)$ et $\bar{v}$ fonction de $\bar{v}/S_o$
sont présentées sous forme tabellaires et graphiques pour
les IMER n-GLUC-DH-G, n-GLUC-DH-Ti et v-GLUC-DH-Ti res-
pectivement. Les valeurs expérimentales pour le débit Q ,
la longueur l et le diamètre intérieur du tube ϕ_{in} sont
respectivement :

Q	$= 716,7 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	pour la n-Gluc-DH-G
l	$= 3 \text{ m}$	(tableau 3, fig. 20
ϕ_{in}	$= 1,5 \text{ mm}$	et 21)
Q	$= 757,5 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	pour la n-Gluc-DH-Ti
l	$= 2,6 \text{ m}$	(tableau 4, fig. 22
ϕ_{in}	$= 1,90 \text{ mm}$	et 23)
Q	$= 821 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	pour la v-Gluc-DH-Ti
l	$= 66,0 \text{ m}$	(tableau 5, fig. 24
ϕ_{in}	$= 1 \text{ mm}$	et 25)

Les valeurs pour K'_M , V'_{max} et A_s sont calculées par régres-
sion linéaire en utilisant les équations [8], [9] et [16]
respectivement (tableaux) ou estimées graphiquement (figu-
res). Dans le tableau 6, tous ces paramètres sont résumés
avec les valeurs du pH optimum et de l'énergie d'activa-
tion.

Tableau 3a

C_i $M \cdot 10^{-3}$	S_O $M \cdot 10^{-4}$	S_O^{-1} $M^{-1} \cdot 10^2$	$1/\bar{v}$ $\text{mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot 10^4$	$\bar{v}$ $M \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-5}$	[NADH] $M \cdot 10^{-4}$
20	57,0	1,750	2,903	3,444	0,480
25	71,25	1,403	2,504	3,993	0,557
33,3	94,9	1,053	2,063	4,847	0,676
40	114,0	0,877	1,833	5,455	0,761
50	142,5	0,701	1,665	6,006	0,838
100	285,0	0,350	1,150	8,700	1,21
200	570,0	0,175	0,979	10,214	1,425

$1/\bar{v}$ fonction de $1/S_O$ donne :

$$K'_M = 1,60 \cdot 10^{-2} M$$

$$V'_{\max} = 1,32 \cdot 10^{-4} M \cdot \text{min}^{-1}$$

Tableau 3b

S_O $M \cdot 10^{-4}$	$\bar{v}/S_O$ $\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}$	$\bar{v}$ $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-5}$	[NADH] $M \cdot 10^{-4}$	$\ln(1-x)$ 10^{-3}
57,0	6,043	3,444	0,480	- 8,456
71,25	5,605	3,993	0,557	- 7,848
94,9	5,107	4,847	0,676	- 7,148
114,0	4,785	5,455	0,761	- 6,698
143,0	4,214	6,00	0,838	- 5,898
285,0	3,052	8,70	1,210	- 4,254
570,0	1,792	10,21	1,425	- 2,503

xS_O fonction de $\ln(1-x)$ donne :

$$K'_M = 1,64 \cdot 10^{-2} M$$

$$A_S = 0,44 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$\bar{v}$ fonction de $\bar{v}/S_O$ donne :

$$K'_M = 1,65 \cdot 10^{-2} M$$

$$V'_{\max} = 1,33 \cdot 10^{-4} M \cdot \text{min}^{-1}$$

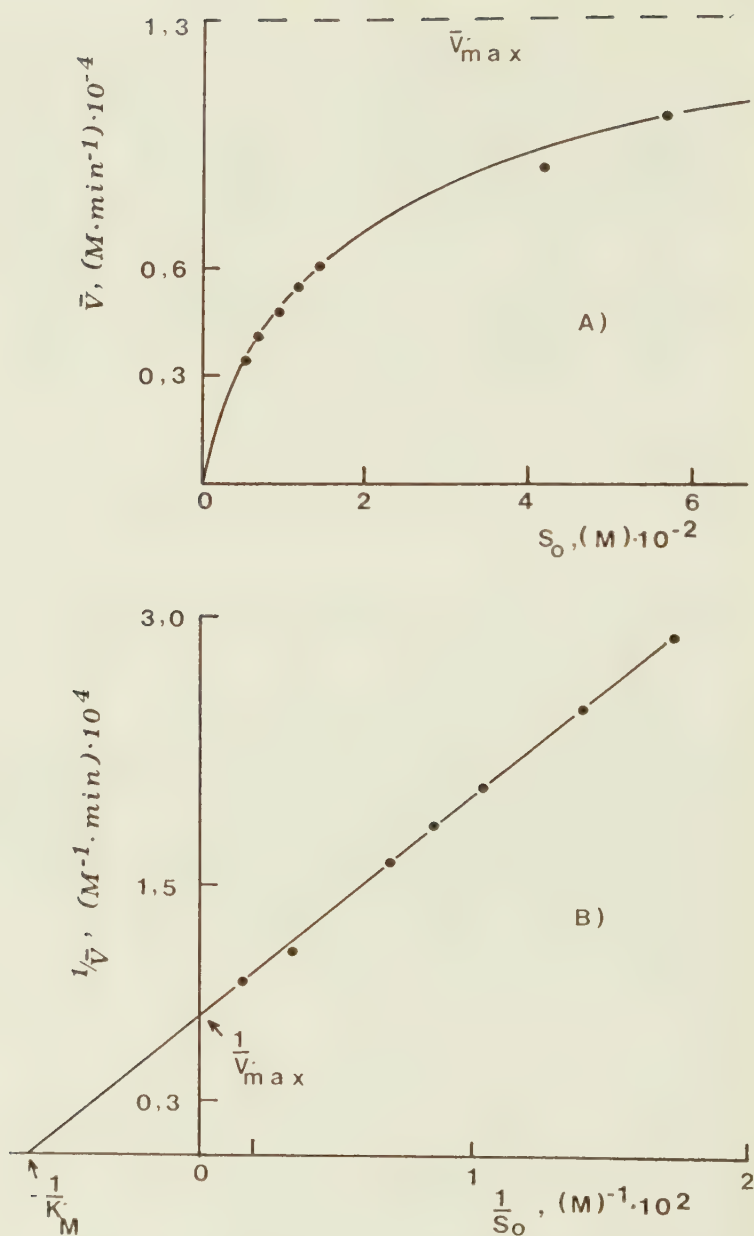


FIG. 20 n-GLUC-DH-G

A) EFFET DE LA CONCENTRATION DU GLUCOSE SUR LA VITESSE DE RÉACTION

B) REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER - BURK

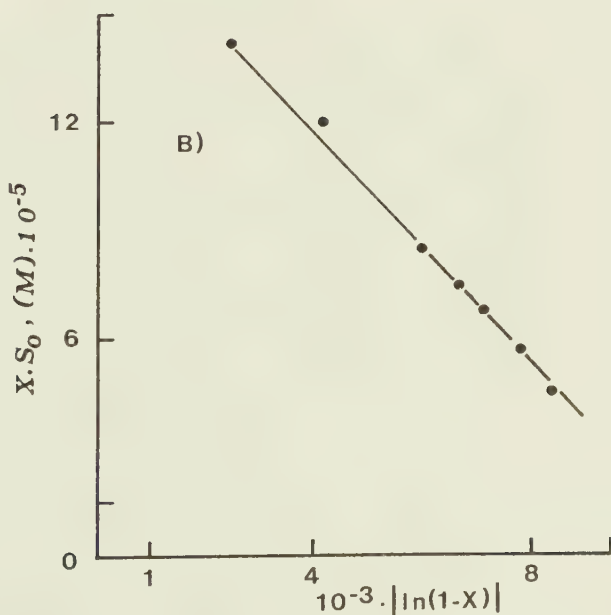
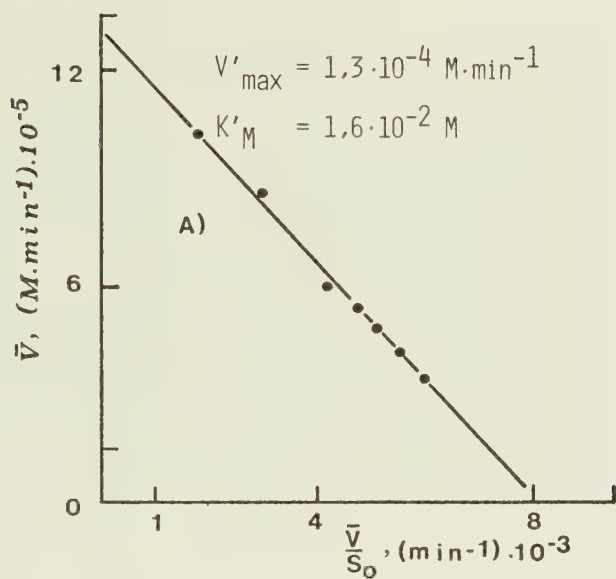


Fig. 21 n-Gluc-DH-G A) Représentation de Hofstee
B) Représentation de xS_0 fonction de $\ln(1-x)$

Tableau 4a

C_i $M \cdot 10^{-3}$	S_o $M \cdot 10^{-4}$	S_o^{-1} $M^{-1} \cdot 10^2$	$1/\bar{v}$ $mol^{-1} \cdot min \cdot 10^4$	$\bar{v}$ $mol \cdot min^{-1} \cdot 10^{-5}$	[NADH] $M \cdot 10^{-5}$
20	57,0	1,75	2,517	3,972	5,244
25	71,25	1,403	2,152	4,646	6,133
33,3	94,9	1,053	1,753	5,704	7,530
40	114,0	0,877	1,563	6,398	8,447
50	142,5	0,701	1,315	7,600	10,000
100	285,0	0,350	0,961	10,400	13,730
200	570,0	0,175	0,853	11,720	15,475

$1/\bar{v}$ fonction de $1/S_o$ donne :

$$K'_M = 1,80 \cdot 10^{-2} M$$

$$V'_{max} = 1,60 \cdot 10^{-4} M \cdot min^{-1}$$

Tableau 4b

S_o $M \cdot 10^{-4}$	$\bar{v}/S_o$ $min^{-1} \cdot ml$	$\bar{v}$ $mol \cdot min^{-1} \cdot 10^{-5}$	[NADH] $M \cdot 10^{-5}$	$\ln(1-x)$ 10^{-3}
57,0	6,968	3,972	5,244	- 9,242
71,25	6,520	4,646	6,133	- 8,645
94,9	6,010	5,700	7,530	- 7,975
114,0	5,612	6,398	8,447	- 7,437
142,5	5,333	7,600	10,000	- 7,060
285,0	3,649	10,400	13,730	- 4,830
570,0	2,056	11,720	15,475	- 2,718

xS_o fonction de $\ln(1-x)$ donne :

$$K'_M = 1,64 \cdot 10^{-2} M$$

$$A_s = 0,60 \mu mol \cdot cm^{-1} \cdot min^{-1}$$

$\bar{v}$ fonction de $\bar{v}/S_o$ donne :

$$K'_M = 1,65 \cdot 10^{-2} M$$

$$V'_{max} = 1,57 \cdot 10^{-4} M \cdot min^{-1}$$

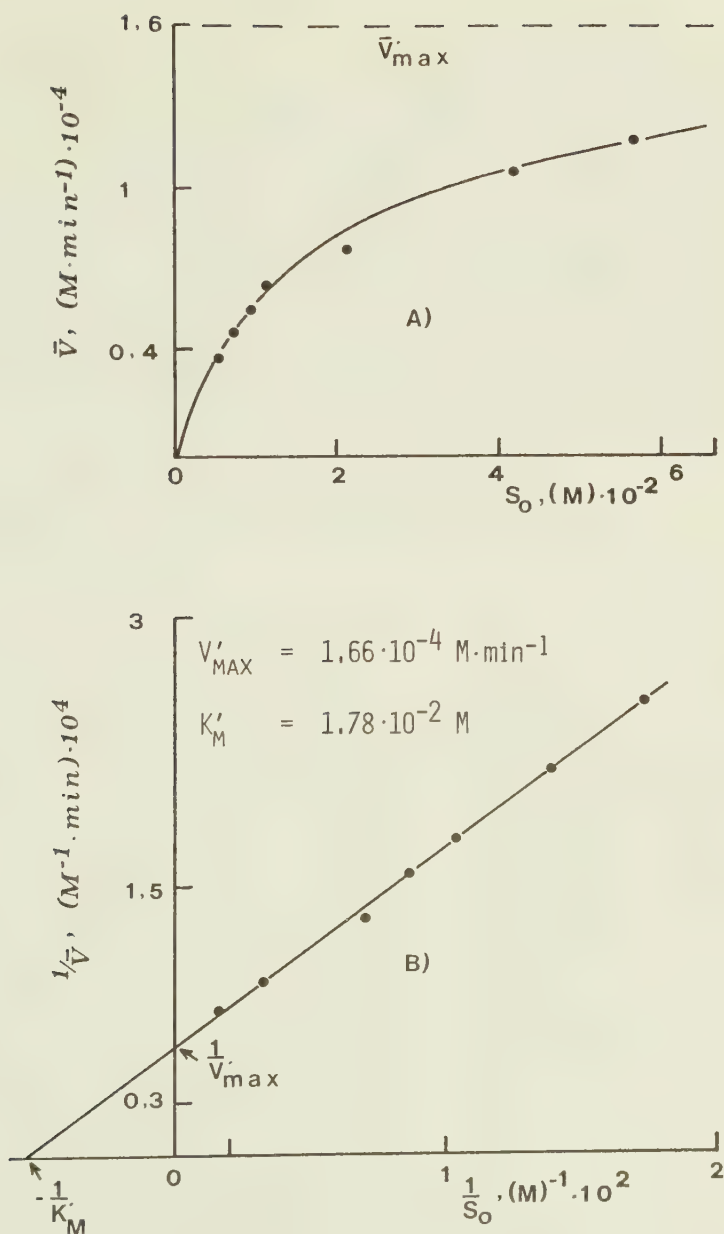


FIG. 22 n-GLUC-DH-TI A) EFFET DE LA CONCENTRATION DU GLUCOSE SUR LA VITESSE DE RÉACTION
B) REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK



Fig. 23 n-Gluc-DH-Ti A) Représentation de Hofstee
B) Variation de xS_0 en fonction de $\ln(1-x)$

Tableau 5a

C_i $M \cdot 10^{-3}$	S_O $M \cdot 10^{-4}$	S_O^{-1} $M^{-1} \cdot 10^2$	$1/\bar{v}$ $mol^{-1} \cdot min \cdot 10^3$	$\bar{v}$ $mol \cdot min^{-1} \cdot 10^{-4}$	[NADH] $M \cdot 10^{-3}$
20	57	1,750	6,278	1,592	0,194
25	71,25	1,403	5,320	1,880	0,229
33,3	94,9	1,053	4,397	2,274	0,277
40	114,0	0,877	3,885	2,574	0,313
50	142,5	0,701	3,510	2,850	0,347
60	171,0	0,585	3,337	2,996	0,365
100	285,0	0,350	2,380	4,200	0,511
200	570,0	0,175	2,107	4,745	0,578

$1/S_O$ fonction de $1/\bar{v}$ donne : $K'_M = 1,65 \cdot 10^{-2} M$

$$V'_{max} = 6,2 \cdot 10^{-4} M \cdot min^{-1}$$

Tableau 5b

S_O $M \cdot 10^{-4}$	$\bar{v}/S_O$ $l \cdot min^{-1} \cdot 10^{-2}$	$\bar{v}$ $mol \cdot min^{-1} \cdot 10^{-4}$	[NADH] $M \cdot 10^{-3}$	$\ln (1-x)$ 10^{-2}
57,0	2,793	1,592	0,194	- 3,462
71,25	2,638	1,880	0,229	- 3,267
94,9	2,396	2,274	0,277	- 2,962
114,0	2,258	2,574	0,313	- 2,788
142,5	2,000	2,850	0,347	- 2,465
171,0	1,752	2,996	0,365	- 2,157
285,0	1,473	4,200	0,511	- 1,800
570,0	0,832	4,745	0,578	- 1,020

xS_O fonction de $\ln (1-x)$ donne : $K'_M = 1,61 \cdot 10^{-2} M$

$$A_S = 9,4 \mu mol \cdot cm^{-1} \cdot min^{-1}$$

$\bar{v}$ fonction de $\bar{v}/S_O$ donne : $K'_M = 1,65 \cdot 10^{-2} M$

$$V'_{max} = 6,2 \cdot 10^{-4} M \cdot min^{-1}$$

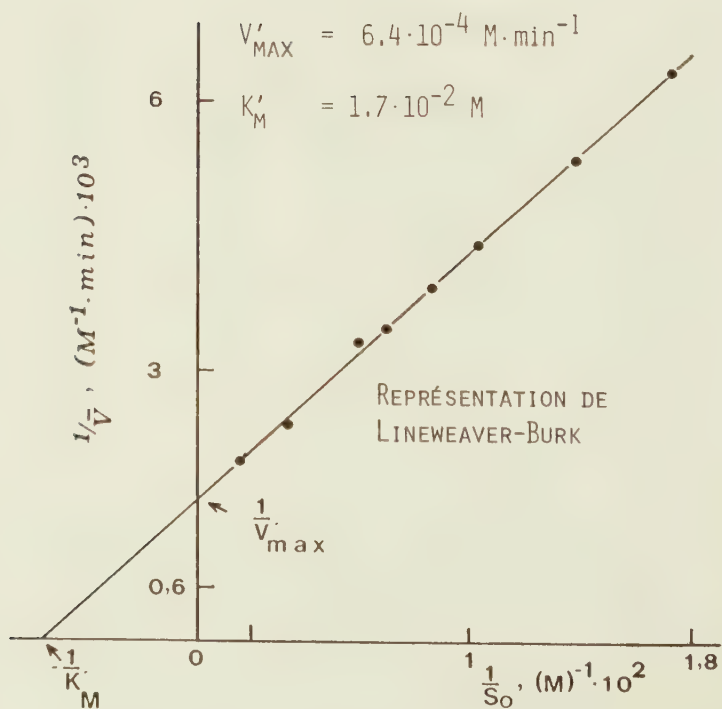
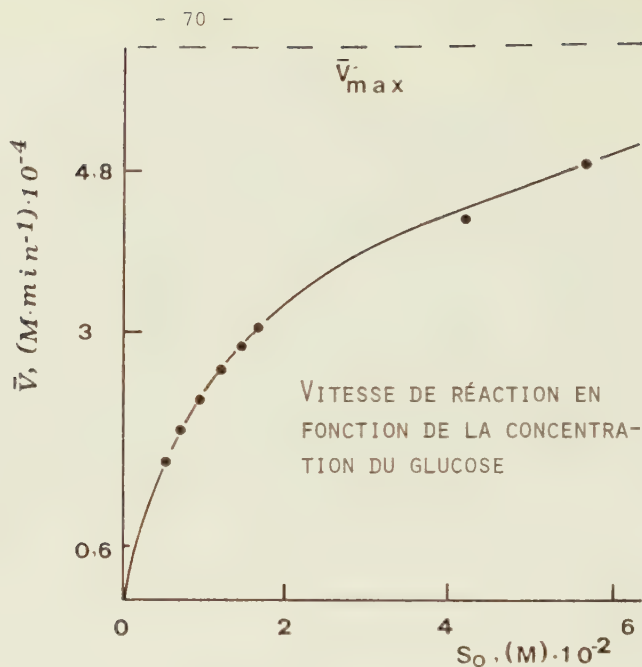


FIG. 24

v-GLUC-DH-T_I

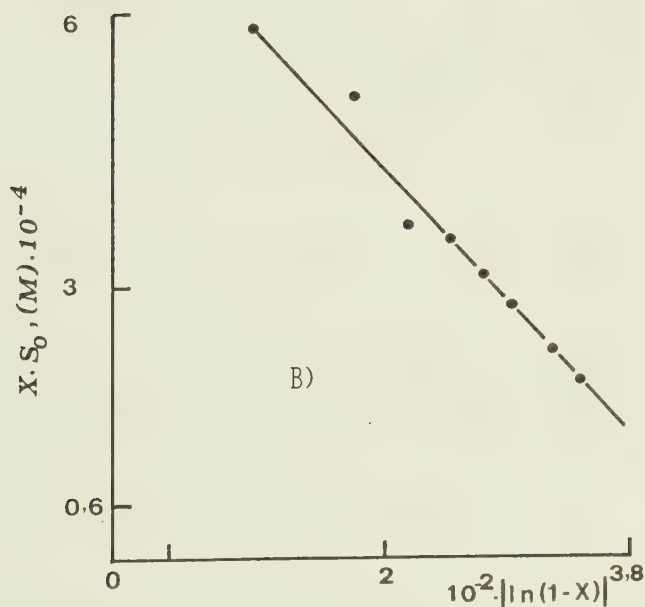
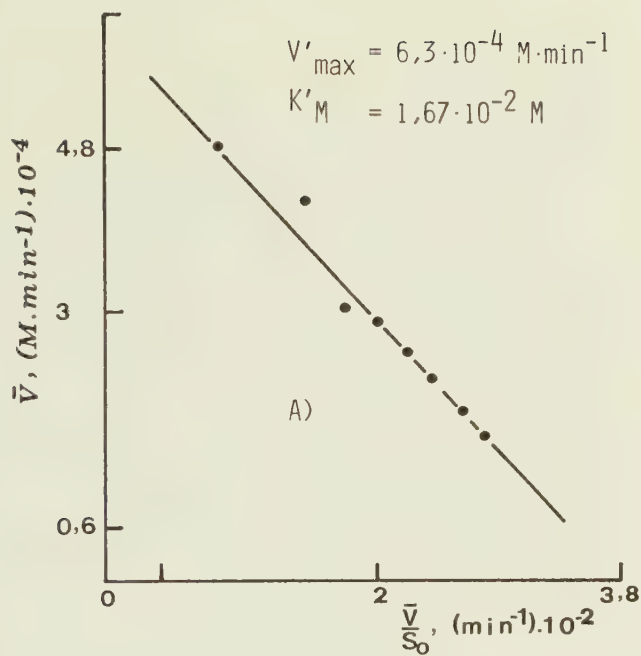


Fig. 25 v-Gluc-DH-Ti

A) Représentation de Hofstee
 B) Variation de xS_0 en fonction de $\ln(1-x)$

Paramètres cinétiques des dérivés de la Gluc-DH

Dérivés	$*K'_M$ $M \cdot 10^{-2}$	pH optimum	E_a KJ/mol	A_s $\mu\text{mol} \cdot \text{Cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (108)
n-Gluc-DH G	1,62	7,2 - 7,5 0,1M phosphate	33,4	0,44
n-Gluc-DG-Ti	1,7	7,3 - 7,6 0,1M phosphate		0,6
n-Gluc-DH-Zr	1,4	7,5 0,05M Tris/HCl		0,4
n-Gluc-DH-v	1,3	7,3 - 7,6 0,1M phosphate	23,17	2,24
n-Gluc-DH-Mo	1,6	7,1 - 7,5 0,1M phosphate		0,045
v-Gluc-DH-Ti	1,63	7,7 0,1M phosphate		9,4
Gluc-DH	2 (exp.) 1 (107) 4,75 (103)	8 (103) Tris/HCl	69,45	

* La déviation standard sur les valeurs de K'_M calculée est de 2,5 %.

3.1.2. Discussions

Nous avons émis l'hypothèse que la cinétique pour les IMER dans les conditions expérimentales du flux continu suivait la loi de Michaelis-Menten. Les différentes représentations utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques (fig. 20-25) montrent bien que l'oxydation du glucose catalysée par la Gluc-DH immobilisée est en effet gouvernée par la loi de Michaelis. Ceci est évident en particulier pour les concentrations élevées du glucose qui, dans certaines expériences, dépassait la valeur de K'_M jusqu'à un facteur de 10. Même à ces fortes concentrations, il n'y avait aucune déviation des droites obtenues par les représentations selon Lineweaver-Burk ou selon Hofstee. Lorsque $[S] \gg K'_M$, la vitesse de réaction devient presque indépendante de la concentration du substrat. Cependant, dans le cas d'un contrôle par diffusion, la vitesse serait toujours de premier ordre en substrat. De plus, le K'_M des dérivés de la Gluc-DH est en moyenne identique au K_M de l'enzyme libre ($2 \cdot 10^{-2} M$). Ceci prouve que les méthodes d'immobilisation utilisées n'affectent pas les caractéristiques intrinsèques de l'enzyme et que les limitations dues aux phénomènes de diffusion peuvent être négligées.

3.1.2.1. Effet du pH sur l'activité

Les profils du pH (fig. 26-29) donnent lieu à des observations intéressantes.

Tous les dérivés de la GOD présentent un pH optimum à 6 (fig. 29). P. León et al (106) trouvent le même pH optimum pour la GOD immobilisée dans un tube de nylon; la GOD immobilisée sur l'oxyde de nickel (107) a son optimum d'activité à pH 5,6.

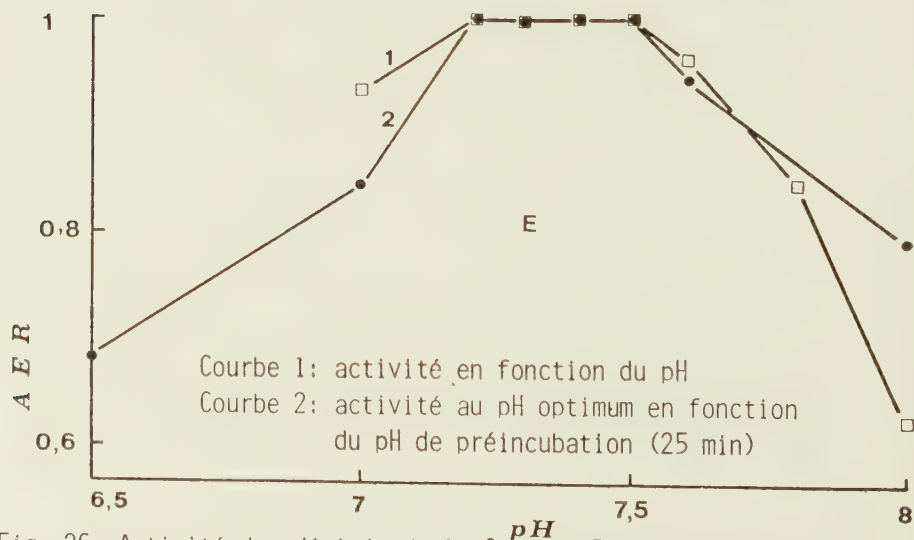
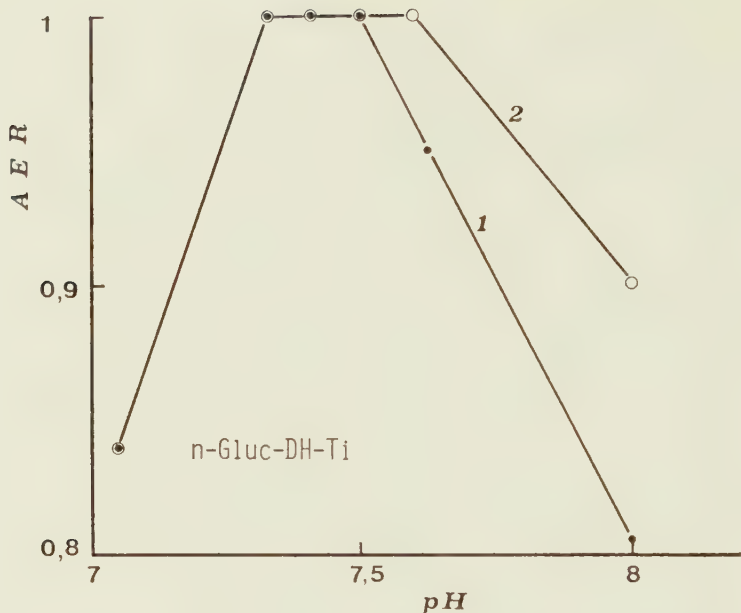


Fig. 26 Activité des dérivés de la Glucose-Déshydrogénase en fonction du pH (25°C, NAD^+ 4,4 mM, Glucose 27,8 mmol/l)

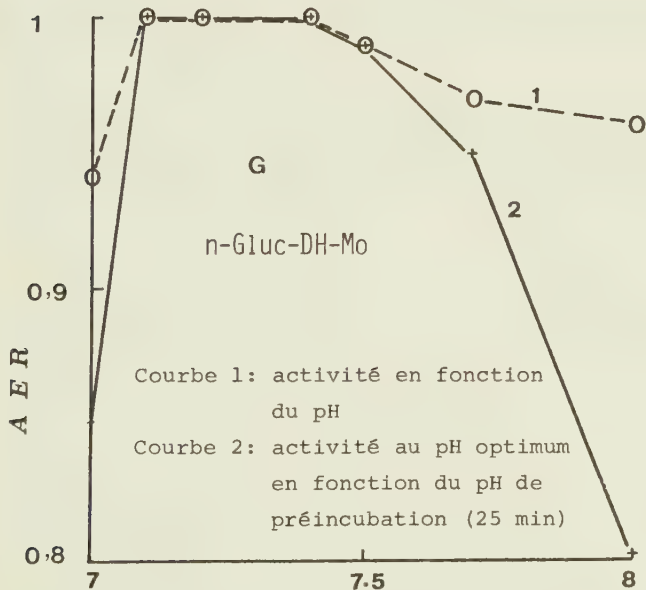
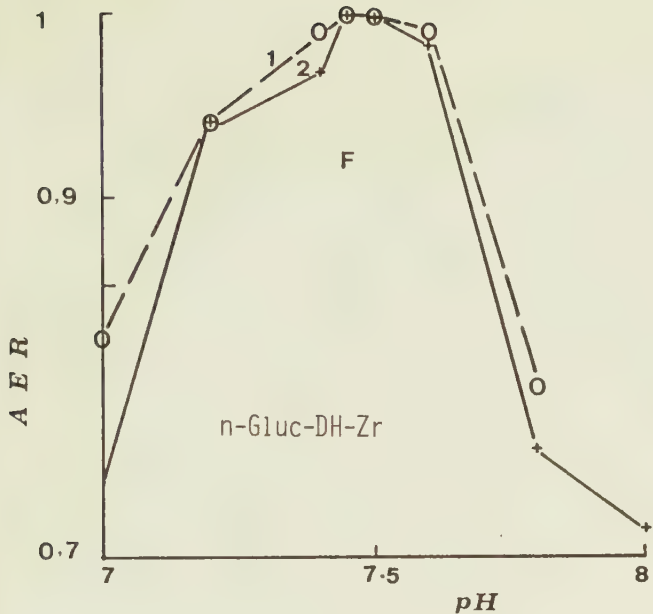


Fig. 27 Activité des dérivés de la Glucose-Déshydrogénase en fonction du pH (25°C, NAD^+ 4,4 mM, Glucose 27,8 mmol/l)

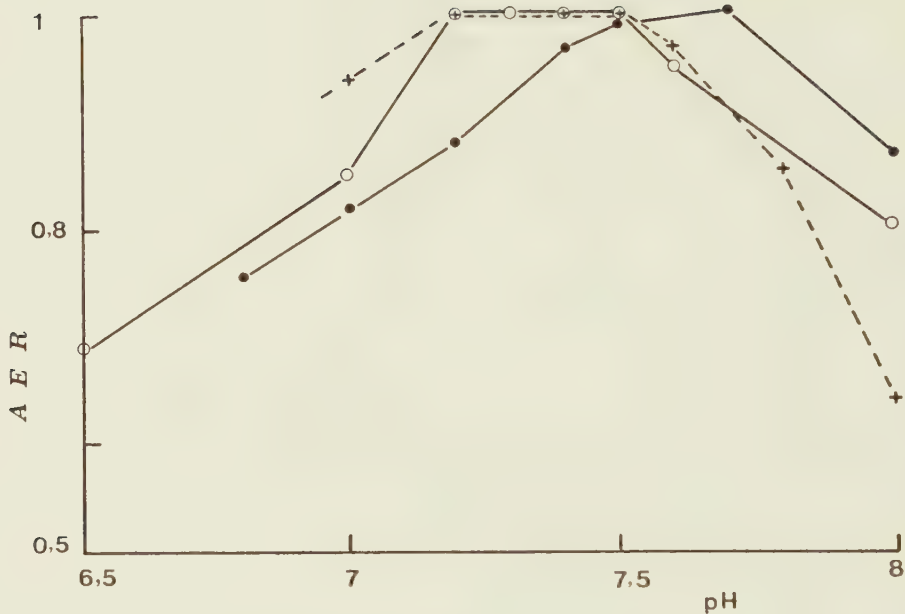


Fig. 28 Variation de l'activité des dérivés de la Glucose-Déshydrogénase en fonction du pH

- + - n-Gluc-DH-G
- o - n-Gluc-DH-Ti
- ● - v-Gluc-DH-Ti

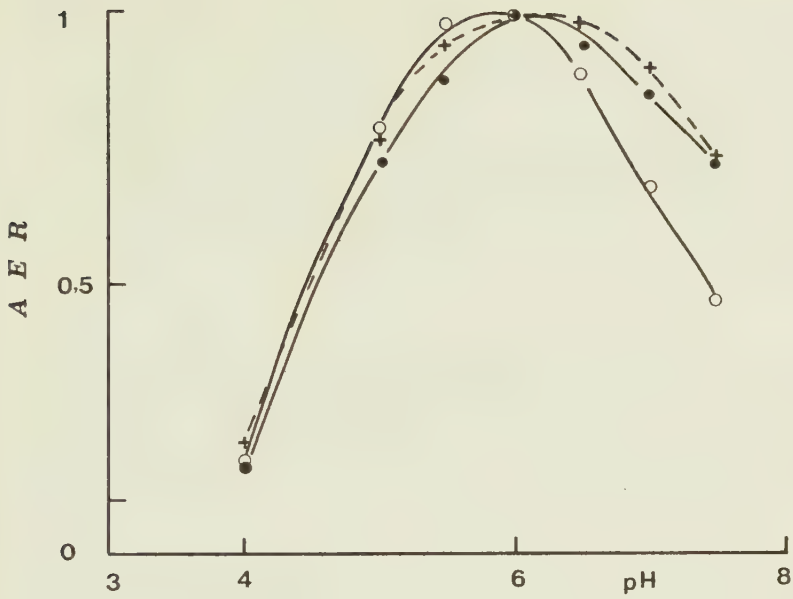


Fig. 29 Activité des dérivés de la Glucose-Oxydase en fonction du pH

- + - n-GOD-Mo
- • - n-GOD-V
- o - v-GOD-Ti

Par contre, les dérivés de la glucose-déshydrogénase présentent un pH optimum qui varie selon le pont et le support utilisés (tableau 6); le déplacement de pH optimum est de 0,3 à 0,9 unité. Le plus grand déplacement (0,9 unité de pH) est observé lorsque le chlorure de molybdène (MoCl_5) est utilisé comme pont d'immobilisation (fig. 27 G). Le plus faible déplacement, 0,3 unité de pH, est obtenu avec la glucose-déshydrogénase immobilisée dans les serpentins de verre.

Tous les dérivés de la Gluc-DH sont inactivés irréversiblement au-dessous de pH 7 et partiellement au-dessus à l'exception de la n-Gluc-DH-Mo qui montre une inactivation partiellement réversible dans tout le domaine étudié (fig. 27 G).

En admettant qu'il n'y a pas de changement des paramètres cinétiques intrinsèques de la Gluc-DH, les variations de pH observées peuvent être théoriquement expliquées par des effets d'interaction charge-charge entre le support et l'environnement proche du site actif de l'enzyme immobilisée. En effet, sous l'action du champ électrostatique, il peut y avoir des modifications de la répartition des protons et du coenzyme (NAD^+) entre le support, le reste de la solution et le "microenvironnement" de l'enzyme. Des observations faites par différents auteurs (108, 109) soutiennent l'hypothèse selon laquelle les supports chargés positivement causent un déplacement de pH optimum vers les pH acides, alors que ceux chargés négativement le font en sens inverse. En d'autres termes, la concentration en protons sera plus grande dans le reste de la solution que dans le "microenvironnement" de l'enzyme pour les matrices positives et inversement pour les supports négatifs. Dans notre cas, les sels des métaux de transition, TiCl_4 , VCl_4 , ZrCl_4 et MoCl_5 , indui-

sent une charge positive sur le nylon hydrolysé.

De même par clivage non hydrolytique du nylon, il y a apparition de charges positives. La charge induite par TiCl_4 , ZrCl_4 et VCl_4 a le même effet sur le pH que celle induite par le clivage non hydrolytique. Par contre, la charge induite par MoCl_5 a un effet plus grand. Sur du verre, l'action de charge induite par TiCl_4 tend à diminuer.

3.1.2.2. Influence de la force ionique I sur K_M

Pour la Gluc-DH ainsi que pour ses dérivés, on note une augmentation de K_M en fonction de la force ionique (tableau 7). En négligeant les phénomènes de diffusion pour les dérivés et en considérant que le substrat (β -D-glucose) est neutre, la variation de K_M en fonction de la force ionique résulterait, comme pour le pH, de l'effet d'interaction charge-charge entre le site actif et les particules chargées (Na^+ , Cl^- , H^+ , NAD^+) de la solution.

Le fait que l'augmentation de K_M soit plus faible pour les dérivés que pour l'enzyme libre s'explique par la présence des charges sur le support qui diminueraient cette interaction.

Certains exemples de variations de K_M' en fonction de la force ionique ont été signalés dans la littérature, notamment la bromeline immobilisée sur la CM-cellulose (110). Le support et le substrat sont de signe opposé, ce qui permet une accumulation du substrat sur le proche environnement du site actif. L'augmentation de la force ionique diminue cette accumulation et, de ce fait, cause une augmentation de K_M' .

Tableau 7

Détermination des énergies d'activation

Dérivés	n-Gluc-DH-V		Gluc-DH-G		Gluc-DH	
	$V'_{\max}$ $M \cdot \min^{-1} \cdot 10^{-4}$	$\log V'_{\max}$	$V'_{\max}$ $M \cdot \min^{-1} \cdot 10^{-4}$	$\log V'_{\max}$	$V_{\max}$ $M \cdot \min^{-1} \cdot 10^{-4}$	$\log V_{\max}$
$T^{\circ}K \ 1/T \cdot 10^{-3}$						
298 3,356	3,43	- 3,46	1,80	- 3,73	1	5
303 3,3	3,90	- 3,4	2,35	- 3,629	0,12	4,92
307 3,257	4,45	- 3,35	2,67	- 3,573		
308 3,247					0,248	- 4,6
310 3,226	4,70	- 3,3	3,03	- 3,518		
313 3,195					0,212	- 4,673
*Ea KJ/mol	23,17		33,4		69,45	

* Les énergies d'activation ont été déterminées entre 25 et 37°C.

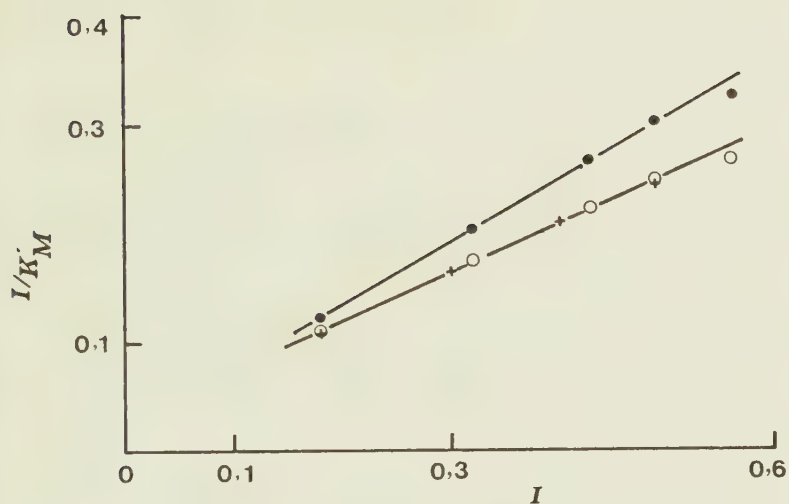


Fig. 30

Représentation de I/K_M en fonction de I

- ● - n-Gluc-DH-G
- ○ - n-Gluc-DH-V
- + - v-Gluc-DH-Ti

En se basant sur l'équilibre de Donnan, C.W. Wharton et al (110), ont établi une relation entre le K'_M et la force ionique I.

Selon leur hypothèse, s'il n'y a pas de sélectivité d'ions dans le réacteur, I/K'_M en fonction de I devrait être linéaire. La figure 30 montre que c'est le cas pour les dérivés de la Gluc-DH. De ce qui précède, nous pouvons déduire que les variations observées sur les paramètres cinétiques des dérivés de la Gluc-DH sont dues principalement aux effets de charge, effets qui pourraient également être l'une des causes de leur moins grande stabilité.

3.1.2.3. Effet thermique

3.1.2.3.1. Profils thermiques des dérivés de la GOD

Les réacteurs de la GOD (fig. 31) présentent une activité maximum à 45°C pour la série de concentration du glucose utilisée. La transformation du glucose est linéaire dans le domaine de 20 à 45°C.

Pour la GOD immobilisée sur l'oxyde de nickel, Howard et al (107) trouvent une activité maximum à 43°C et un domaine de grande stabilité thermique entre 10 et 40°C, tandis que l'enzyme libre a son maximum à 23°C.

D'après P. León et al (106), l'optimum d'activité est obtenu à 32°C pour la GOD dans un tube de nylon. Nous remarquons donc que la GOD immobilisée est thermiquement plus stable que l'enzyme libre; cette stabilité varie avec les méthodes d'immobilisation.

3.1.2.3.2. Profils thermiques des dérivés de la Gluc-DH

Les profils thermiques de la Gluc-DH immobilisée sont représentés par les figures 32 et 33. Les IMER à la Gluc-DH

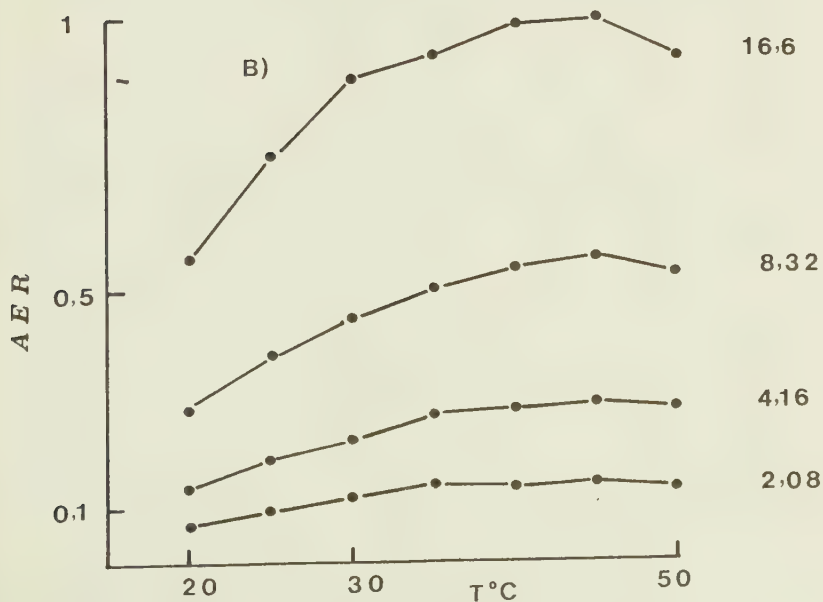
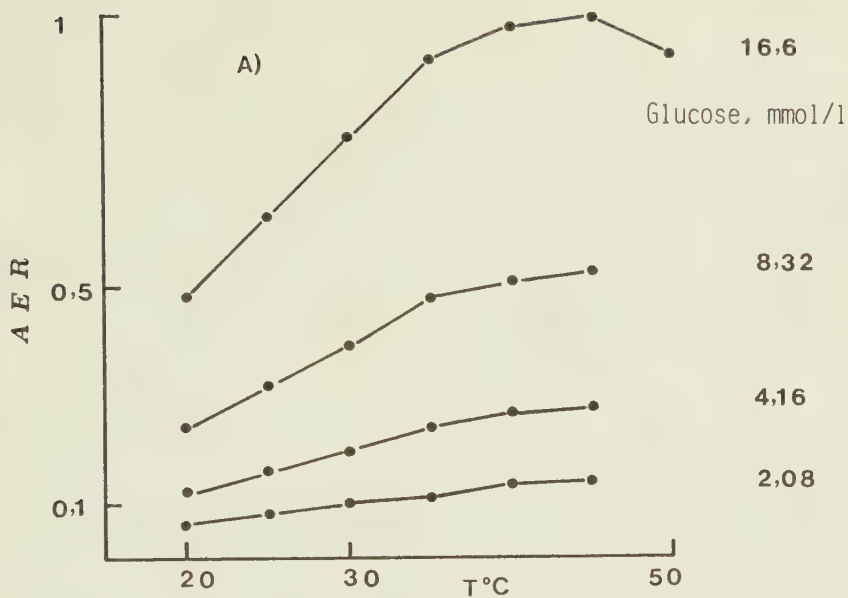


Fig. 31 Activité de la GOD en fonction de la température (le temps d'incubation est de 30 min)

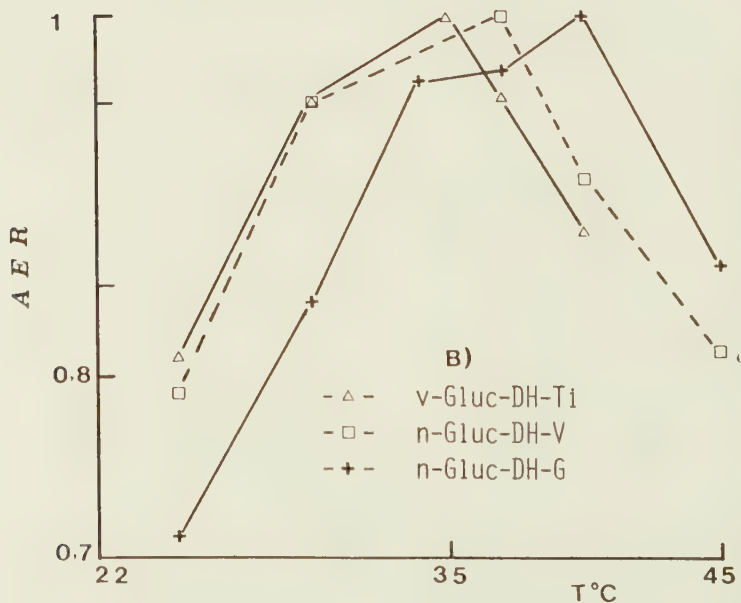
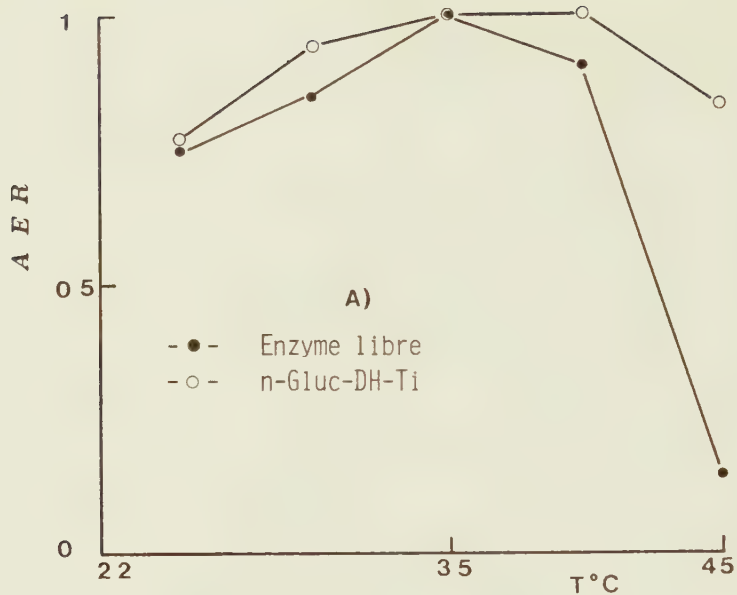


Fig. 32 Activité de la Gluc-DH en fonction de la température (NAD 4,4 mM, Glucose 27,8 mmol/l, temps d'incubation 30 min)

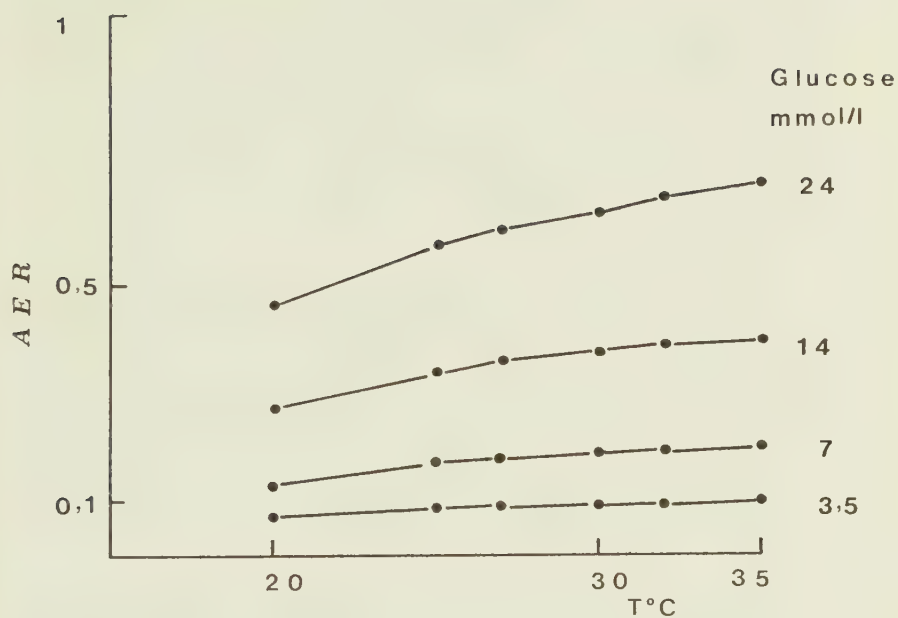


FIG. 33 ACTIVITÉ DE LA n-GLUC-DH-Ti EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

montrent un optimum d'activité entre 35 et 40°C.

Comme pour la GOD immobilisée, la catalyse de l'oxydation du glucose par la Gluc-DH immobilisée est linéaire dans le domaine d'activation des dérivés (fig. 33). D'après les énergies d'activation déterminées (tableau 8) pour la Gluc-DH, la n-Gluc-DH-V et la n-Gluc-DH-G, l'enzyme libre paraît être thermiquement plus stable que ses dérivés entre 20 et 35°C. Cependant, la Gluc-DH se désactive plus rapidement que ses dérivés au-dessus de 35°C (fig. 32A).

La représentation de $\log V'_{\max}$ en fonction de $1/T$ (fig. 34) nous permet de tirer des informations sur la déviation de la cinétique admise dans les IMER. Les énergies d'activation en elles-mêmes sont peu significatives. Par contre, la non linéarité de la représentation d'Arrhenius, si elle avait lieu, pourrait être interprétée comme un changement de paramètre ou comme une désactivation de l'enzyme dans le domaine de température étudié.

3.1.2.4. Influence du pH dans la fixation des enzymes

Comme illustré dans la figure 35, le rendement en activité enzymatique peut être influencé par le pH d'immobilisation. En effet, le site actif de l'enzyme est souvent composé de groupes ionisables dans une forme bien déterminée pour fixer le substrat ou catalyser la réaction. A un pH donné, le phénomène de répartition des espèces chargées déjà décrit peut affecter les groupes responsables de l'activité enzymatique lors de l'immobilisation; le support même peut être sensible au pH. Il pourrait alors en résulter une baisse d'activité après immobilisation.

Les changements observés dans les paramètres cinétiques sont souvent apparents. Il est impossible de préciser de quoi ils dépendent.

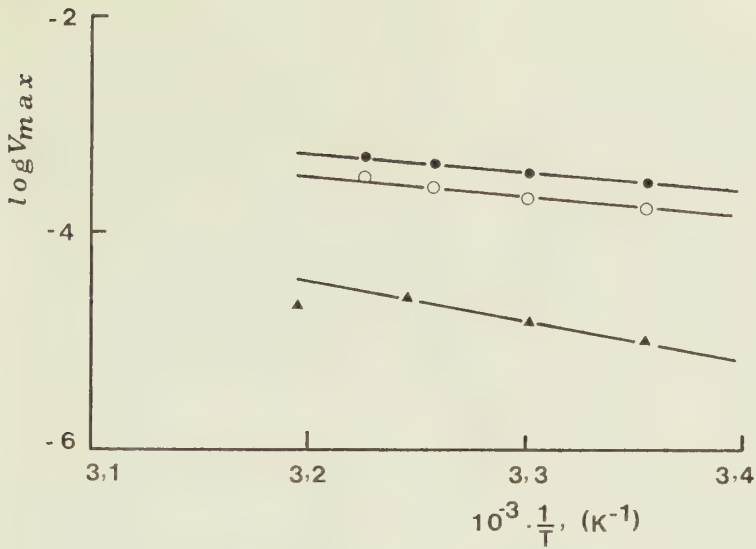


FIG. 34 REPRÉSENTATION D'ARRHENIUS
 - ● - n-GLUC-DH-V, - ○ - n-GLUC-DH-G
 - ▲ - GLUC-DH (EN SOLUTION HOMOGÈNE)

Tableau 8: Variation du K'_M en fonction de la force ionique I.

I	$K'_M (M \cdot 10^{-2})$			
$mScm^{-1}$	Gluc-DH	n-Gluc-DH-v	n-Gluc-DH-G	v-Gluc-DH-Ti
5	1,72			
12,5	1,95			
18	2,00	1,65	1,50	1,50
30	5,53			1,77
32		1,82	1,53	1,80
40	13,00			1,90
43		1,95	1,57	
49		2,00	1,60	2,05
56		2,10	1,70	

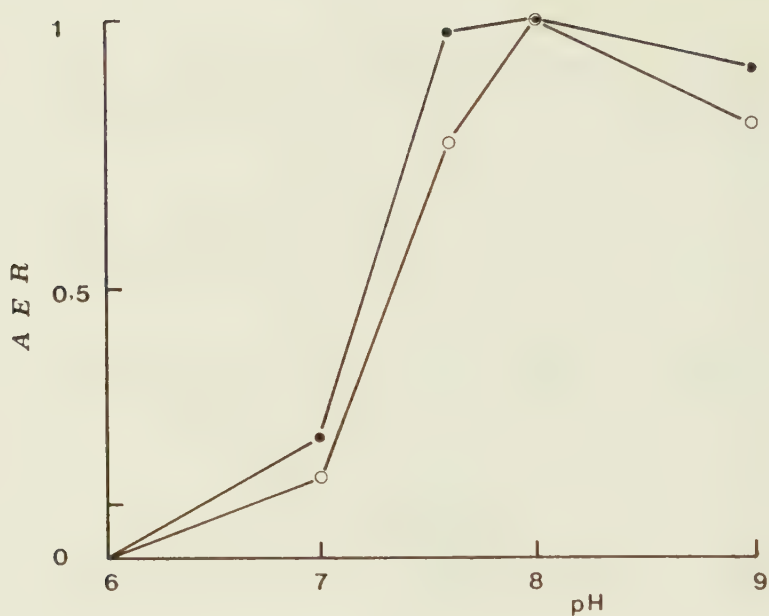


Fig. 35 Effet de pH d'immobilisation sur le rendement en activité après immobilisation, le rendement est donné en activité enzymatique relative (AER)

- ○ - n-Gluc-DH-G

- ● - n-Gluc-DH-Ti

Ils peuvent être causés aussi bien par l'influence du "microenvironnement" que par la technique d'immobilisation qui imposerait un changement de conformation à l'enzyme ou un encombrement stérique au niveau du site actif.

3.1.2.5. Influence des silanes dans l'immobilisation de la Gluc-DH à l'intérieur des serpentins de verre

Lors de l'immobilisation, des protéines peuvent être adsorbées à la surface du support, surtout dans le cas des matrices chargées.

Ainsi, afin de déterminer l'influence de l'adsorption des protéines à la surface intérieure des serpentins de verre, nous avons procédé à une série d'expériences dont les résultats sont résumés dans le tableau 9. Bien que ces valeurs soient relatives, on peut dire que la contribution de l'adsorption est faible dans nos conditions expérimentales et que le rendement en activité enzymatique relative (AER) est fonction à la fois du silane et de la concentration du tétrachlorure de titane. Les résultats du tableau 10 montrent l'influence des différents silanes sur le rendement en activité enzymatique après immobilisation. Le fait que nous pouvons immobiliser la Gluc-DH en utilisant différents silanes (tableau 10) confirme notre hypothèse (chapitre 2.2) selon laquelle l'activation du verre silanisé par le tétrachlorure de titane se fait par l'intermédiaire des groupes hydrolysables du silane.

Tableau 9

Contribution de l'adsorption à la surface du verre dans l'immobilisation de la Gluc-DH à l'intérieur des serpentins de verre

Dérivés	v - E	v-Ti-E	v-AS-E	v-AS-Ti-E
AER	0,02	0,05	0,06	1,00

v-E = verre - Enzyme

v-Ti-E = verre-TiCl₄-Enzyme

v-AS-E = verre silanisé - Enzyme

v-AS-Ti-E = verre silanisé + TiCl₄ + Enzyme
(réaction d'immobilisation)

Tableau 10

Influence des silanes sur l'activité relative (AER) de la Gluc-DH immobilisée dans les serpentins de verre

Silanes	γ -aminosilane 10 % dans le toluène	Diphenylsilane- diol 3 % dans le toluène	Tétraéthoxy- silane 10 % ds le toluène
AER	1,00	0,55	0,76

3.1.2.6. Réaction du tétrachlorure de titane lors de l'immobilisation des enzymes à l'intérieur des tubes de nylon

Pour tenter de formuler une hypothèse sur le type de réaction dans l'immobilisation de la Gluc-DH par l'intermédiaire du tétrachlorure de titane, nous avons réalisé deux expériences :

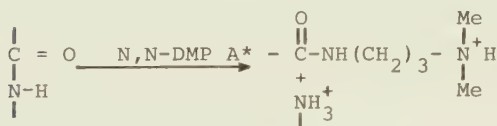
- dans l'une, nous immobilisons l'enzyme après clivage hydrolytique des liaisons peptidiques du nylon (réacteur A)

a) clivage hydrolytique



- dans l'autre, l'enzyme est fixée après clivage non hydrolytique (réacteur B)

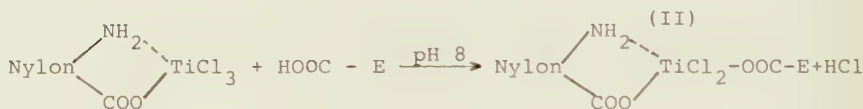
b) clivage non hydrolytique



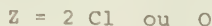
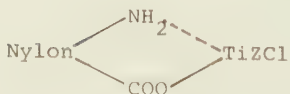
Conservés dans les mêmes conditions, le réacteur B ne conservait que 30 % de son activité originale après un mois, alors que le réacteur A ne montrait aucune perte d'activité après 15 semaines. Ceci peut s'expliquer par le fait que les métaux de transition utilisés sont des acides durs et par conséquent forment des produits plus stables avec des groupes carboxylates qu'avec des groupes d'amines primaires. Aussi, d'après Feld et Cowe (111), les complexes Ti-amine s'hydrolysent lentement en solution aqueuse. Sur

* N,N-Diméthyl-1,3-diamino-propane

la base de ces données théoriques et du rapport de stabilité entre les réacteurs A et B, nous pensons que la liaison Ti-nylon se fait de préférence par l'intermédiaire des groupes carboxylates et très peu par des groupes amines primaires créés sur le nylon traité. Nous supposons qu'il en est de même de la liaison Ti-enzyme. Le mécanisme suivant est donc proposé :



Le produit (I) étant soumis à un traitement en solution aqueuse (Tris-HCl pH 8), il peut se produire une labilisation supplémentaire d'atomes de chlore avec formation d'oxychlorure (TiOCl_2) de titane substitué qui réagira avec l'enzyme. Le produit (I) pourrait alors se formuler plus généralement :



3.2. Détermination de l'urée par l'uréase immobilisée dans un tube de nylon

L'urée est le plus souvent déterminée par la méthode à la diacétylmonoxime (112). De par la nature unique de cette molécule, la réaction chimique est assez spécifique. Cependant, à cause des réactifs agressifs (acide sulfurique à chaud), le remplacement de cette méthode serait souhaitable. Elle pourrait être substituée par l'uréase immobilisée. En effet, la fréquence d'analyse (fig. 14) de 60/h et la linéarité de la méthode à l'uréase immobilisée (fig. 36) prouvent que le système est intéressant et utilisable dans un laboratoire clinico-chimique. Malheureusement, les réactifs utilisés dans la réaction secondaire pour déterminer l'ammoniaque ne sont guère moins agressifs que ceux de la méthode classique (112). De plus, l'ammoniaque endogène de l'échantillon peut gêner la détermination. La fabrication et la mise au point d'électrodes sélectives de haute fiabilité peuvent rendre la méthode pratique et avantageuse.

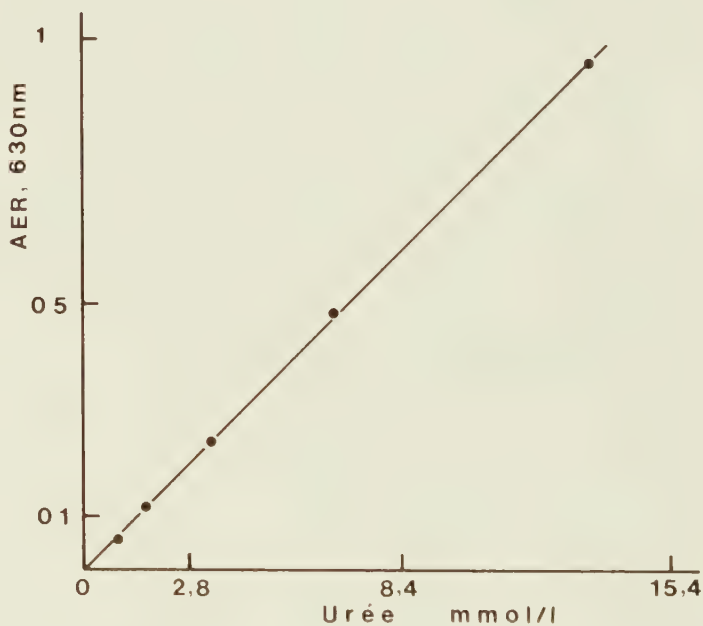


Fig. 36

Domaine de linéarité pour la détermination de l'urée avec l'IMER à l'Uréase (EC3.5.1.5)

3.3. Analyse du glucose

La glucose-oxydase (GOD), l'hexokinase et la glucose-déshydrogénase constituent les trois systèmes enzymatiques habituellement utilisés pour le dosage du glucose.

La GOD est très spécifique pour le β -D-glucose. Cependant, dans les mesures colorimétriques, la réaction chimique de coloration est influencée par des substances réductrices (acide ascorbique, glutathion, ergothionéine, etc.). Dans la réaction catalysée par la GOD, il est plus pratique de mesurer l'eau oxygénée formée par l'ampérométrie. Or, même une détermination directe du peroxyde soufre de l'interaction des substances réductrices.

Par contre, les méthodes à l'hexokinase et à la glucose-déshydrogénase sont plus spécifiques; le produit de la catalyse enzymatique (NADPH ou NADH) est mesuré directement par photométrie à une longueur d'onde donnée. Elles sont donc souvent prises comme méthodes de référence.

La méthode à l'hexokinase conduit à un système de deux enzymes, hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase, dont une coimmobilisation est nécessaire dans la mise au point d'un réacteur à enzyme immobilisée (113). Pour cette raison, nous avons choisi la Gluc-DH qui présente l'avantage d'être un système simple.

Comme c'est souvent le cas pour les systèmes analytiques avec enzyme immobilisée, les diagrammes (fig. 16 - 17) de flux continu avec IMER à la Gluc-DH sont extrêmement simples. Le bruit de fond est faible pour tous les diagrammes et la sensibilité des IMER est telle que nous avons chaque fois pu précéder le réacteur d'un dialyseur. Au cours de l'analyse, des protéines peuvent se fixer par effet électrostatique à la surface du réacteur et

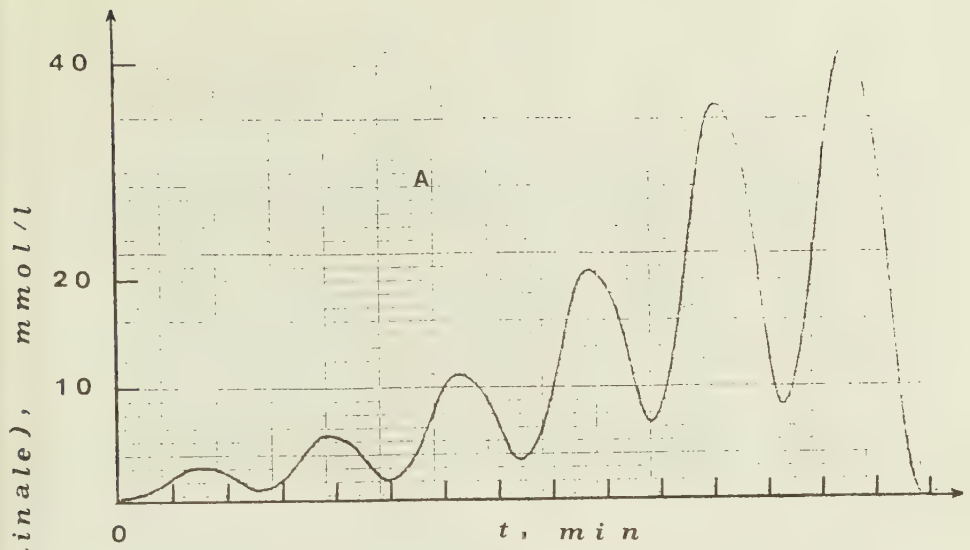
provoquer une désactivation de l'enzyme immobilisée. Par une dialyse automatique, nous éliminons donc les protéines et bien d'autres substances qui pourraient inactiver l'IMER.

Nous avons fait le test de la spécificité avec différentes substances : xylose, galactose, maltose, saccharose, mannose, lactose, fructose, acide ascorbique, acide glucuronique, glutathion, amidon et inuline. Aucune de ces substances n'apparaît être un substrat de la Gluc-DH immobilisée.

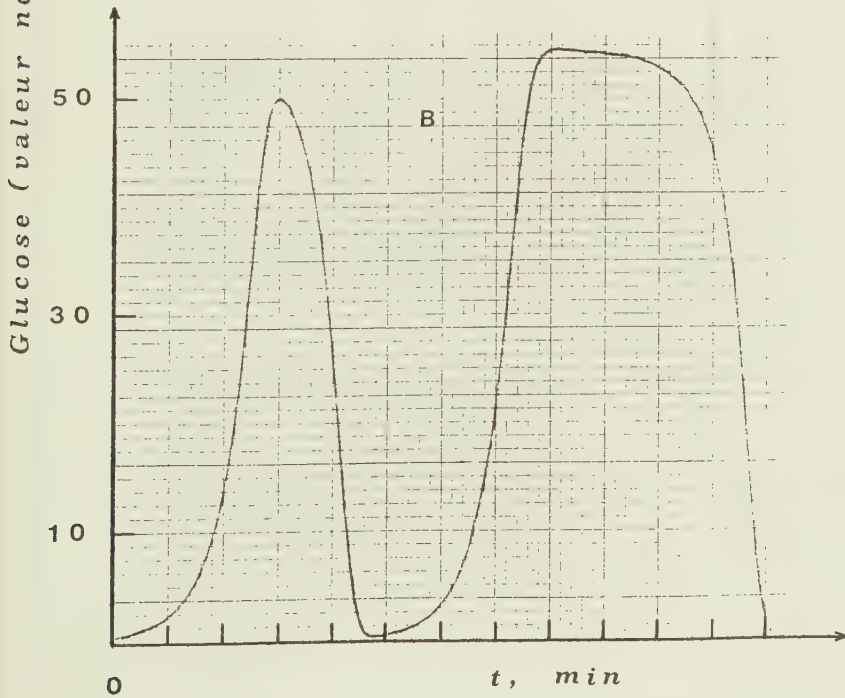
Le domaine de linéarité pour le glucose s'étend dans des conditions analytiques favorables de 0 - 55 mmol/l. En effet, le rendement de la dialyse (25 %) et la dilution due aux réactifs (NAD et NaCl) abaissent la concentration du substrat. Ainsi, la concentration effective du glucose qui entre dans l'IMER est inférieure à K_M . En d'autres termes, dans nos conditions d'analyse, le substrat se trouve dans un domaine de concentration où la réaction est de premier ordre en glucose. En plus, la quantité de substrat transformée en produit ne représente qu'une faible fraction de la quantité totale. On mesure ainsi pratiquement la vitesse initiale de cette réaction.

3.3.1. Analyse du glucose par la v-GOD-Ti

Les réacteurs à la GOD immobilisée sur du verre sont particulièrement intéressants par leur grande activité relative. Nos essais se sont limités à l'analyse du glucose en solution aqueuse. Le diagramme de flux continu (fig. 15) n'a pas été optimisé. Pour cela, les pics d'enregistrement (fig. 37) n'atteignent que 93 % de l'état de régime permanent (steady state). Même dans ces conditions, le domaine de linéarité pour le glucose est de 0 à 22 mmol/l (fig. 38).

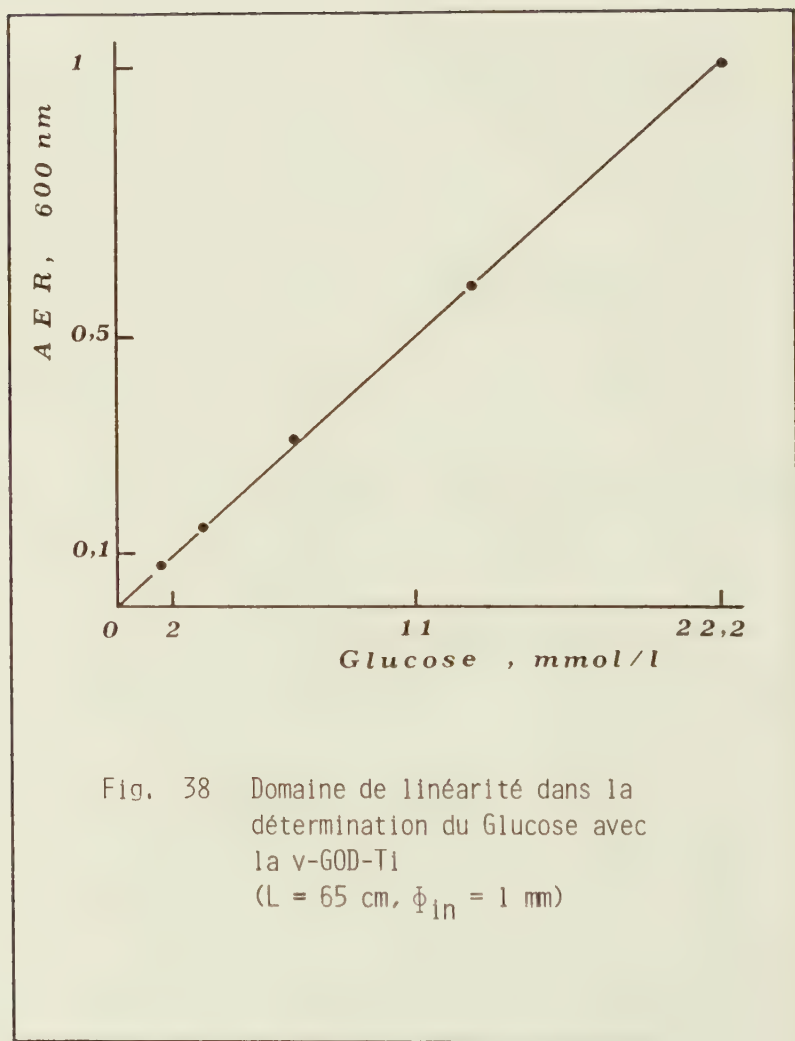


Va ation des signaux analogues avec la concentration



Signal analogue sous conditions d'analyse et de régime permanent

FIG. 37 v-GOD-TI



3.3.2. Analyse du glucose en solution aqueuse par la n-Gluc-DH-G

Dans les conditions représentées par la figure 16, la linéarité de la méthode couvre le domaine de concentration du glucose de 0 à 13 mmol/l (fig. 39). Les pics d'enregistrement (fig. 40) pour l'analyse d'un échantillon de glucose (44,4 mmol/l) prouvent que la méthode est reproductible même à des concentrations élevées de glucose. La variation des hauteurs de pics en fonction de la concentration (fig. 41) montre que les 99 % de l'état de régime permanent sont atteints. Le niveau "steady state" est cependant plus vite atteint par les échantillons de faible concentration.

3.3.3. Analyse du glucose dans le sérum par la n-Gluc-DH-Ti

Linéarité

L'étude de la linéarité montre que la méthode est linéaire dans le domaine de 0 - 30 mmol/l de glucose (fig. 42).

Corrélation avec la méthode de référence

Le coefficient de corrélation entre la méthode de routine (99) et celle à l'enzyme immobilisée a été déterminé sur 93 échantillons par la méthode de régression linéaire. La droite de régression obtenue (fig. 43) prouve qu'il y a une bonne concordance entre les deux méthodes.

Précision et contamination

Comme le montre la courbe d'enregistrement de la figure 44a, la reproductibilité de la méthode est bonne. La figure 44b prouve que la contamination est faible. En effet, le coefficient du "carry over" est de 0,008 pour le système.



Fig. 39 Domaine de linéarité dans la détermination du Glucose en solution aqueuse avec la n-Gluc-DH-G
($L = 3 \text{ m}$, $\phi_{in} = 1,5 \text{ mm}$)

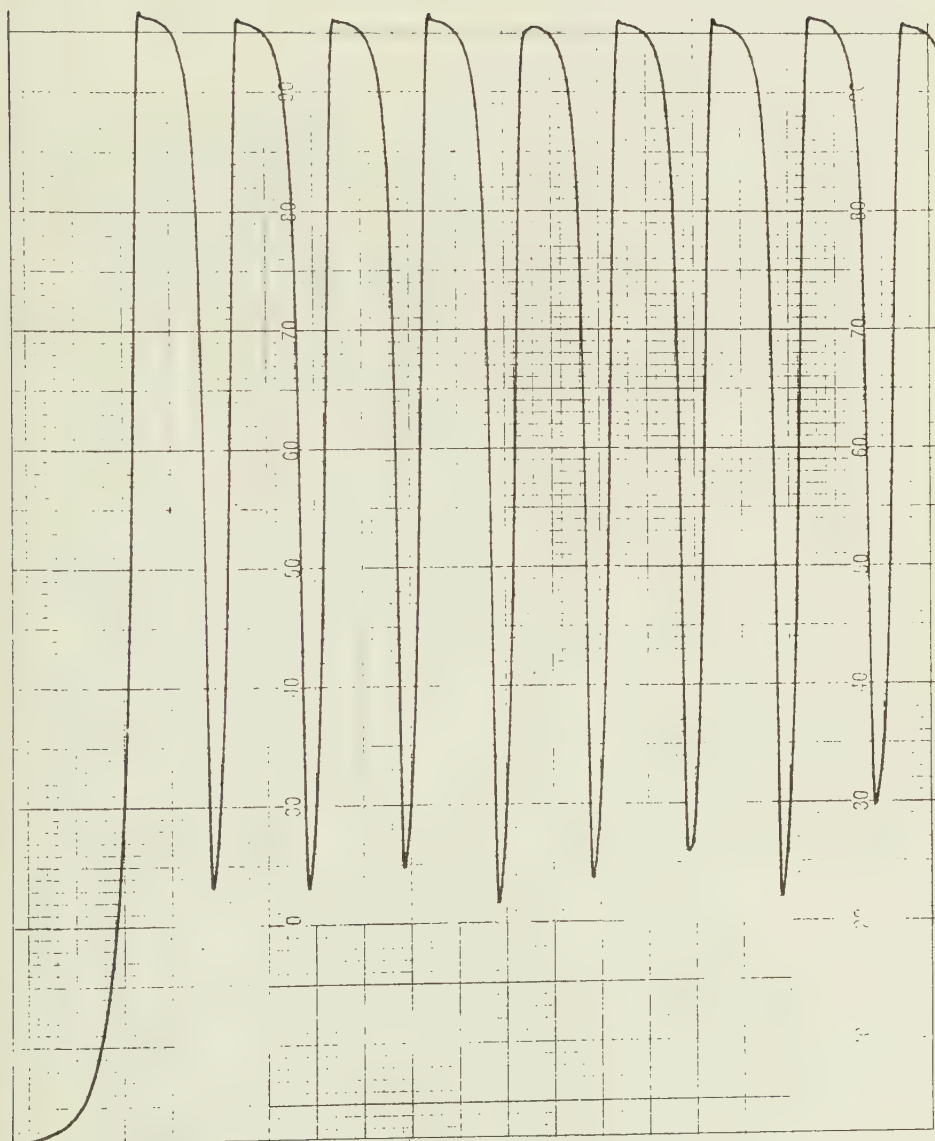


FIG. 40 RÉPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE À LA n-GLUC-DH-G POUR
UNE CONCENTRATION DE 44,4 mmol/l DE GLUCOSE

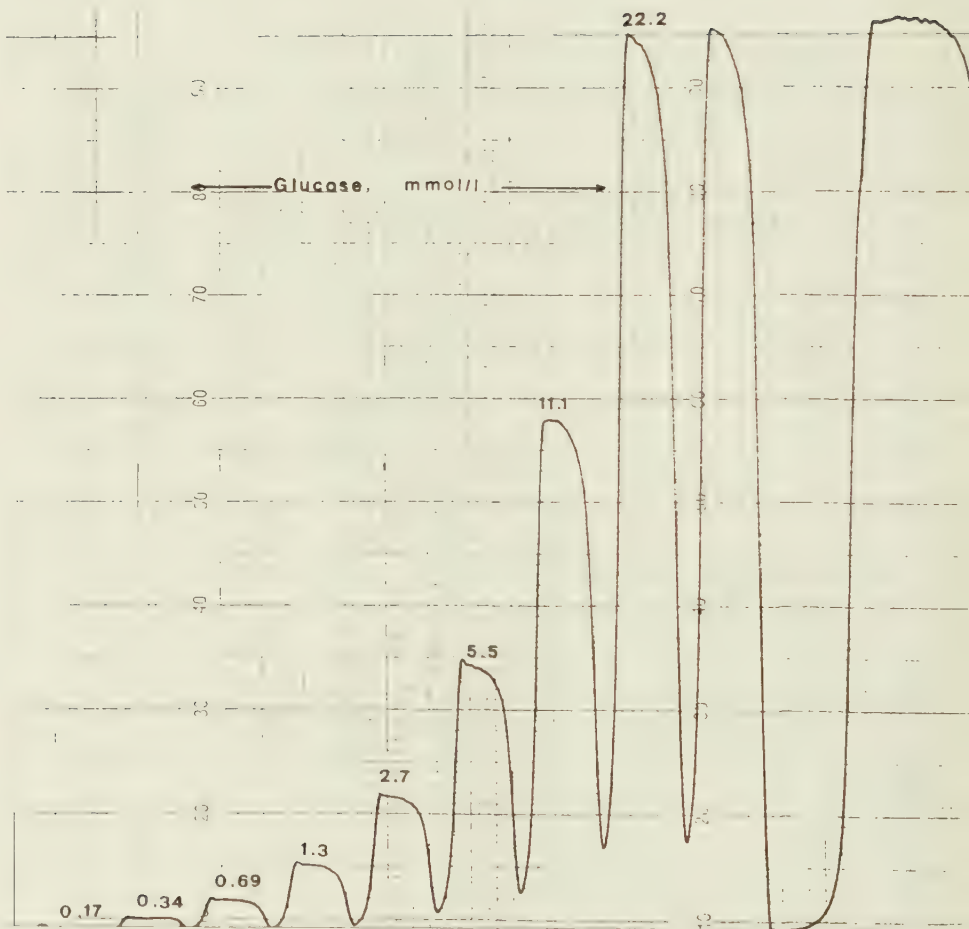


FIG. 41 VARIATION DES SIGNAUX ANALOGUES AVEC LA CONCENTRATION ET RÉGIME PERMANENT (n-GLUC-DH-G)

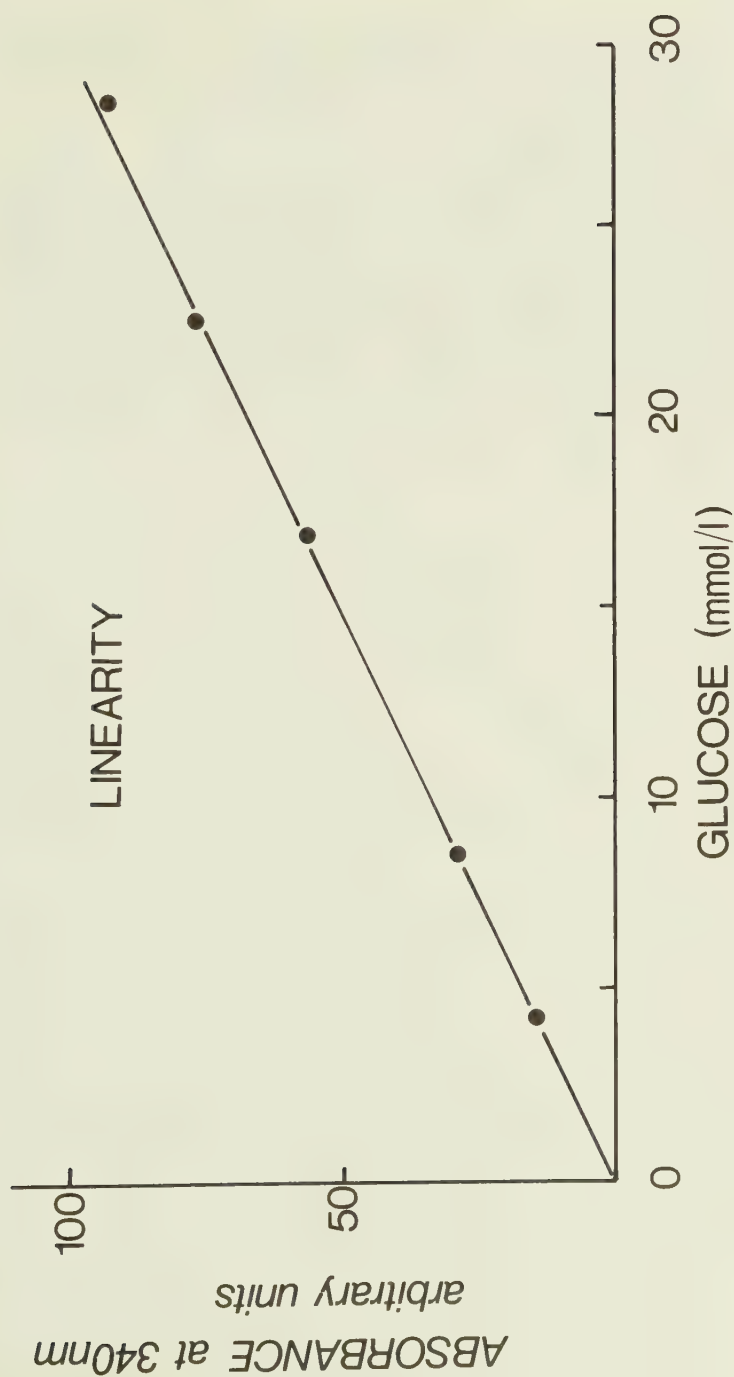


Fig. 42 Domaine de linéarité pour la méthode à la n-Gluc-DH-Ti sur AA II ($L = 3 \text{ m}$, $\phi_{in} = 1,5 \text{ mm}$)

3.3.4. Analyse du glucose dans le sérum par la n-Gluc-DH-Ti sur le SMAC

Contrôle de qualité

Le contrôle de qualité fait pendant 10 jours est reporté dans les tableaux 11 et 12. Pour différents sérums de contrôle, le coefficient de variation (CV) est de 0,02 à 0,04, ceci démontre que la méthode est assez précise. La comparaison avec la méthode à l'enzyme libre (99) donne une bonne corrélation pour 95 échantillons analysés par les deux méthodes. La droite de régression linéaire obtenue est représentée par la figure 45.

Tableau 11

Précision de la n-Gluc-DH-Ti sur le SMAC

	PJ			PJ10		
Sérums de contrôle	N	CE	CV	N	CE	CV
Monitrol I	4	5,55	1,8	12	5,73	3,8
Monitrol II	4	12,8	1,3	12	12,9	2,5
Hyland N	4	4,62	1	12	4,5	3,1
Hyland P	4	10,9	0,4	12	10,9	2,3

Tableau 12

Contrôle de l'exactitude pendant dix jours
(SMAC, n-Gluc-DH-Ti)

Sérums de contrôle	N	CE	CV (%)	CF	Méthode de réf.
Monitrol I	28	5,72	3,4	5,6 5,55	Hexo Gluc-DH
Monitrol II	24	12,9	2,6	12,7 12,4	Hexo Gluc-DH
Hyland N	24	4,5	4,8	4,25	Hexo
Hyland P	24	10,85	2,6	11,1	Hexo

N = nombre de dosages (valeur moyenne)

CE = concentration du glucose (mmol/l) trouvée expérimentalement par la méthode à l'enzyme immobilisée

CV = coefficient de variation en %

PJ = précision pendant une journée

PJ10 = précision de jour en jour pendant dix jours

PJS1 = précision de jour en jour pendant la première semaine

PJS3 = précision de jour en jour pendant la troisième semaine

Hexo = méthode à l'hexokinase

CF = concentration du glucose (mmol/l) donnée par référence

CORRELATION AAI IMER vs REF

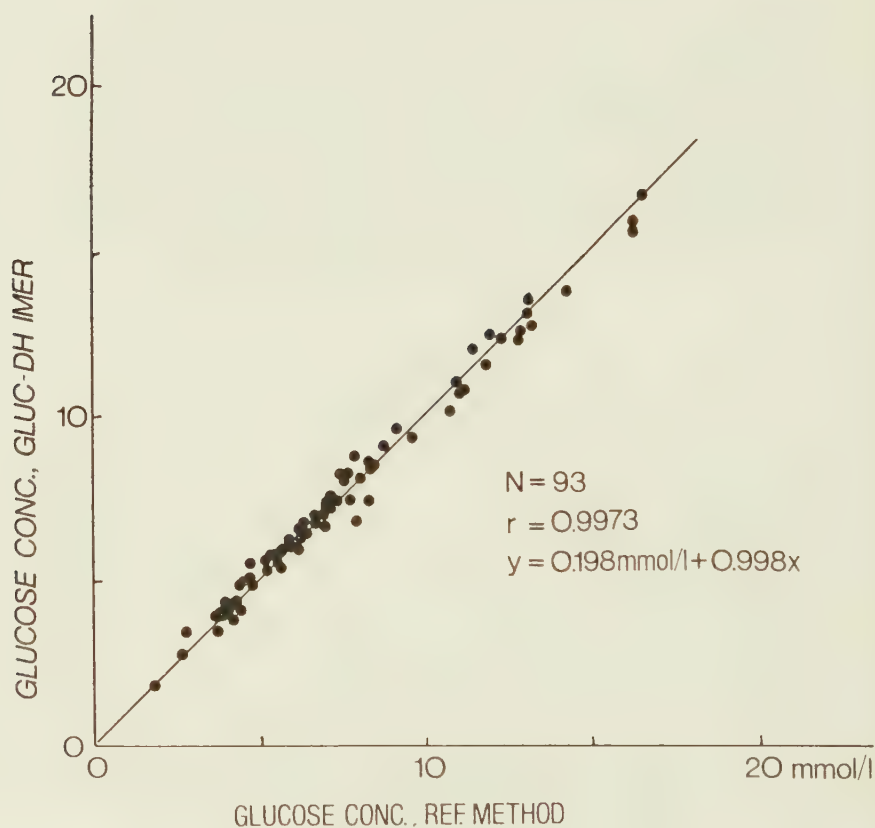


FIG. 43 CORRÉLATION DE LA MÉTHODE À LA n-GLUC-DH-TI
AVEC LA MÉTHODE DÉCRITE PAR
A. SCHOLER et al, (99)

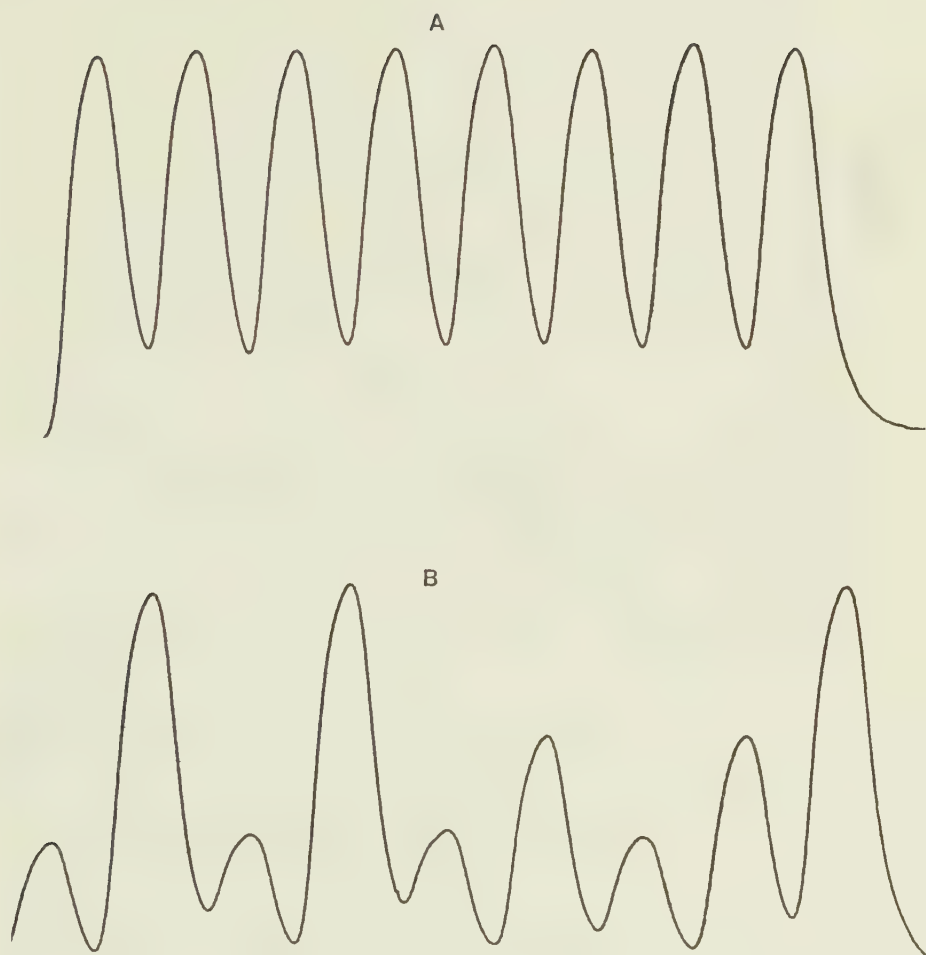


FIG. 44 A) PRÉCISION POUR UNE SÉRIE DE 8 ÉCHANTILLONS
DE MÊME CONCENTRATION (30 mmol/l)
B) ÉTUDE DE LA CONTAMINATION (CARRY-OVER)

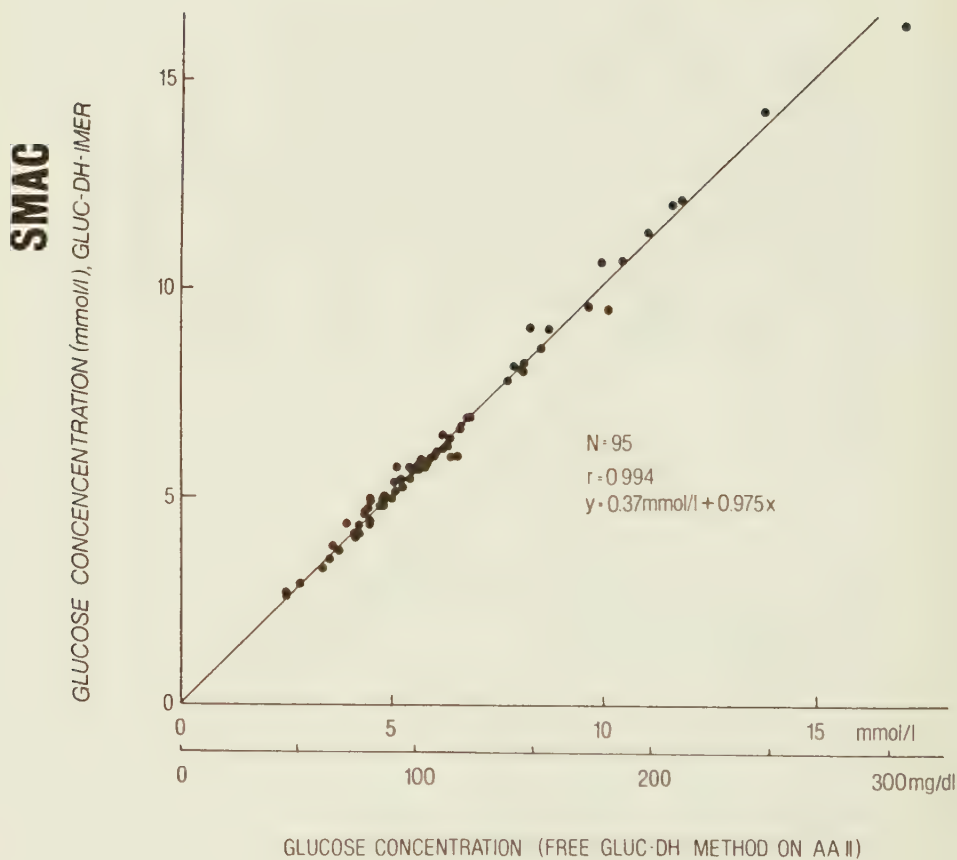


FIG. 45 CORRÉLATION DE LA MÉTHODE À LA n-GLUC-DH-TI
 SUR LE SMAC AVEC LA MÉTHODE DÉCRITE PAR
 A. SCHÖLER et al. (99)

3.3.5. Analyse du glucose dans le sérum par la v-Gluc-DH-Ti sur le SMAC

Comparée aux autres IMER déjà décrits, la glucose déshydrogénase immobilisée sur du verre offre de nombreux avantages dans l'analyse du glucose en flux continu. A part la plus grande activité de l'enzyme et les conditions favorables pour la conservation des serpentins, la linéarité s'étend sur un domaine plus large et la corrélation avec notre méthode de référence peut être qualifiée d'excellente. Comme le montre la figure 46, l'enregistrement sur le SMAC témoigne une bonne performance du système analytique.

Linéarité

L'étude de la linéarité a été faite semaine par semaine pendant 4 semaines où le réacteur était continuellement utilisé (6 h/jour). La figure 47 illustre que la catalyse de l'oxydation du glucose par la v-Gluc-DH-Ti est linéaire de 0 à 55 mmol/l. La méthode reste linéaire même quand l'IMER ne conserve plus que 50 % de son activité initiale.

Contamination

La contamination (fig. 48) déterminée selon la méthode déjà décrite (98) est caractérisée par un coefficient d'interaction de 0,04.

Corrélation avec la méthode de référence

Nous avons examiné la concordance des deux méthodes sur 508 échantillons de patients. Comme le prouve la figure 49, il y a une très bonne corrélation entre les deux systèmes. $\bar{X}$ et $\bar{Y}$ diffèrent de moins de 2,5 %.



FIG. 46 COURBE D'ENREGISTREMENT DANS LES CONDITIONS D'ANALYSE
DU GLUCOSE SUR LE SMAC AVEC LA V-GLUC-DH-TI

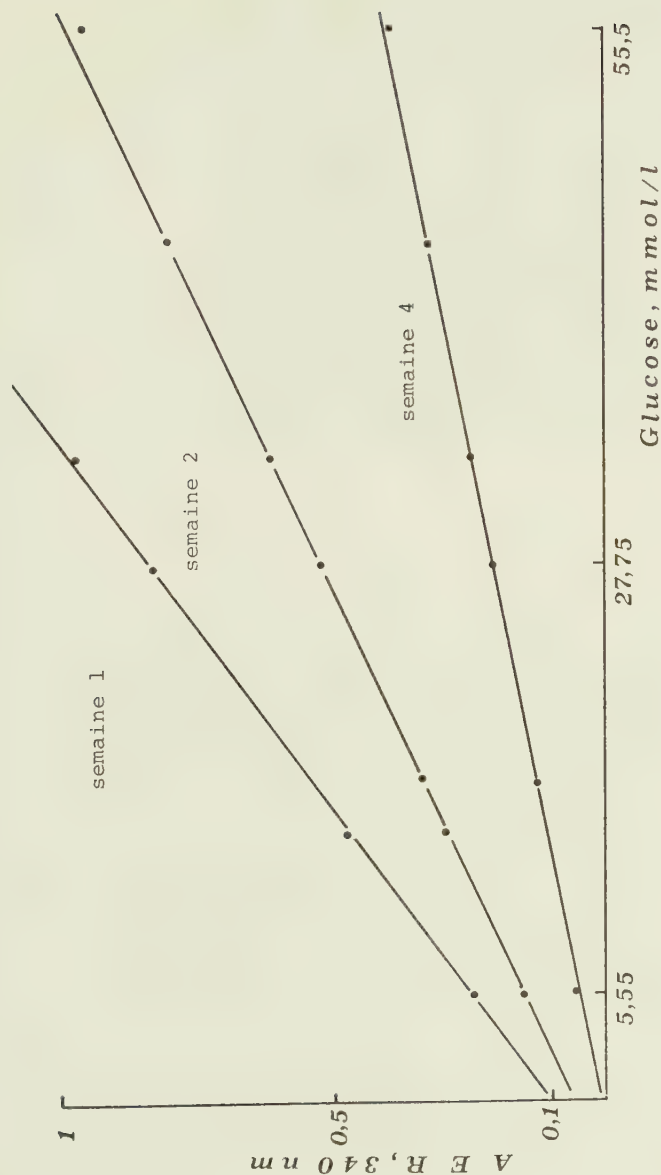


FIG. 47 DOMAINE DE LA LINÉARITÉ SEMAINE PAR SEMAINE PAR LA V-GLUC-DH-TI
UTILISÉE SUR LE SMAC DANS L'ANALYSE DE ROUTINE POUR LE GLUCOSE.

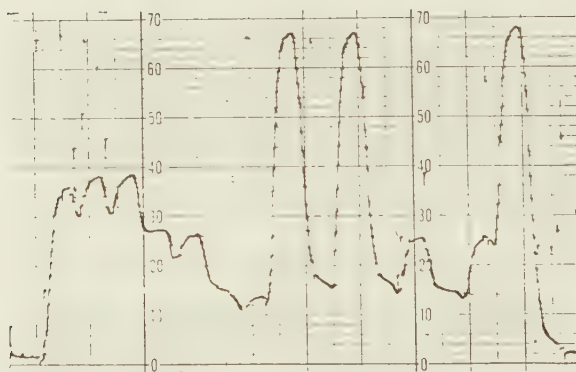
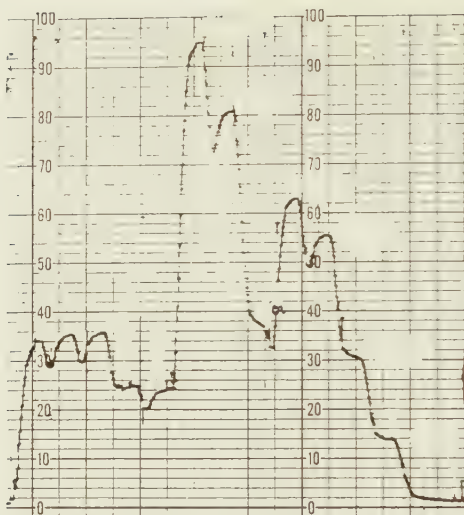


FIG. 48 SIGNAUX ANALOGUES POUR L'ÉTUDE DE LA
CONTAMINATION DANS LA MÉTHODE À LA
V-GLUC-DH-TI SUR LE SMAC.

Contrôle de qualité

Les valeurs pour le contrôle d'exactitude et de précision sont résumées dans les tableaux 13 et 14. Le coefficient de variation (CV) est de 0 à 0,06 pour les différents sérums de contrôle utilisés.

Tableau 13

Précision sur le SMAC avec la v-Gluc-DH-Ti

Sérums de contrôle	PJ			PJS1			PJS3		
	N	CE	CV	N	CE	CV	N	CE	CV
Monitrol I	5	5,5	1,42	14	5,58	4,83	20	5,2	0
Monitrol II	5	12,14	0,95	14	12,25	1	23	11,74	5
Hyland N	5	4,28	1,42	14	4,2	3,63	23	4,15	5,5
Hyland P	5	11,35	0,88	14	11,3	3,2	20	10,74	5,15
Precinorm U	5	5,6	1,77	14	5,57	3,78	17	5,2	0
Seroquant A	5	5,71	2,5	14	5,7	2,8	24	5,4	6,2

Tableau 14

Contrôle de l'exactitude pendant trois semaines
(SMAC, v-Gluc-DH-Ti)

Sérums de contrôle	N	CE	CV (%)	CF	Méthode de réf.
Monitrol I	40	5,4	6,3	5,61 5,55	Hexo Gluc-DH
Monitrol II	40	12,15	2,1	12,7 12,33	Hexo Gluc-DH
Hyland N	36	4,27	5,6	4,22	Hexo
Hyland P	30	11,14	3,2	11,4	Hexo
Precinorm U	38	5,47	4,6	5,44	Hexo
Seroquant A	36	5,55	4,5	5,83	Gluc-DH

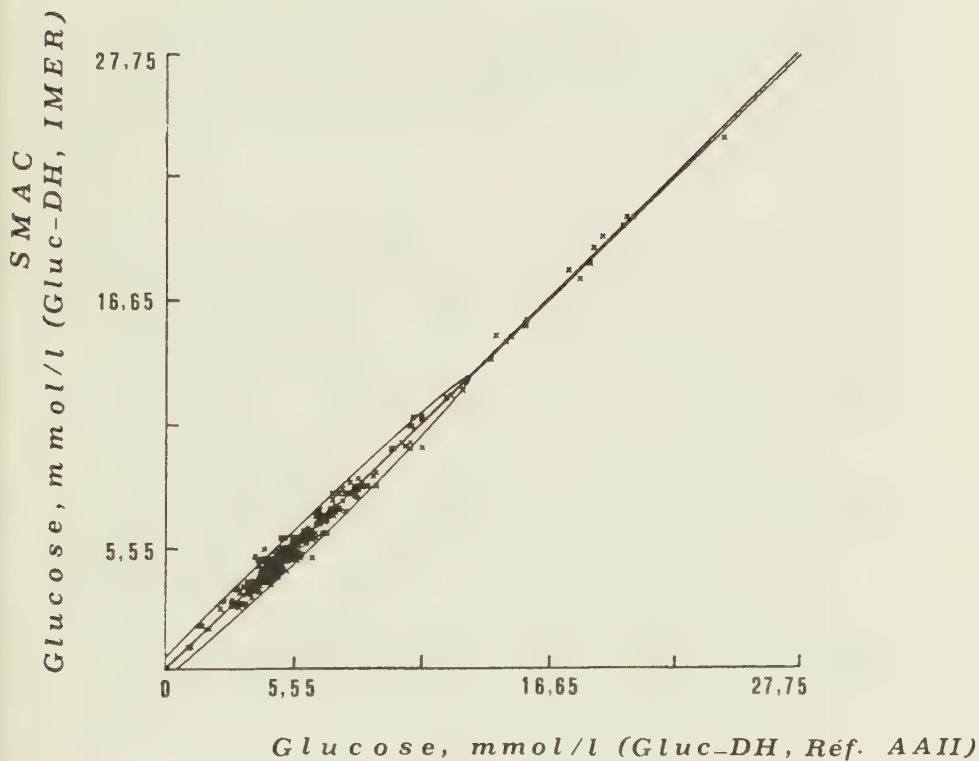


Fig. 49 Corrélation de la méthode à la v-Gluc-DH-Ti sur le SMAC avec la méthode de référence (99)

$N = 508$

$y = 0,0494 + 0,995 \cdot x$

$x = 0,0096 + 0,994 \cdot y$

$\bar{x} = 5,729 \text{ mmol/l}$

$\bar{y} = 5,752 \text{ mmol/l}$

$r = 0,9949$

3.3.6. Perte d'activité dans les IMER

Pour un travail de routine, la perte d'activité des IMER est un problème majeur. L'emploi d'un réacteur enzymatique est souvent limité par la vitesse de perte d'activité. Cette perte de pouvoir catalytique peut être due à une simple élution de l'enzyme par le flux des réactifs, à la présence des substances inhibitrices dans les échantillons ou à un processus de dénaturation provoqué par les bactéries par exemple.

Avec la n-Gluc-DH-Ti (fig. 50), nous n'observons aucune perte d'activité lorsque le réacteur est conservé à basse température (-70°C). Par contre, la conservation à 4°C entraîne une perte d'activité qui varie selon le mode d'entretien et peut atteindre 15 % par semaine. Gardée à -18°C et utilisée à raison de 50 échantillons par semaine, la n-Gluc-DH-Ti perd 70 % de son activité initiale au bout de 10 semaines (fig. 50). La v-Gluc-DH-Ti cependant, utilisée dans la routine (6 h, 400 échantillons par jour), subit une perte d'activité de 50 % au bout de 24 jours. Si la diminution de l'activité suit une loi exponentielle, la représentation du logarithme d'activité en fonction du temps devrait être linéaire (114). Par cette représentation, nous obtenons 23 jours (fig. 51) comme valeur de la demi-vie pour la v-Gluc-DH-Ti.

Il est difficile de formuler un mécanisme de désactivation des IMER pour en tirer des règles de conservation d'activité. Ceci reste toujours un problème d'expérience de longue durée.

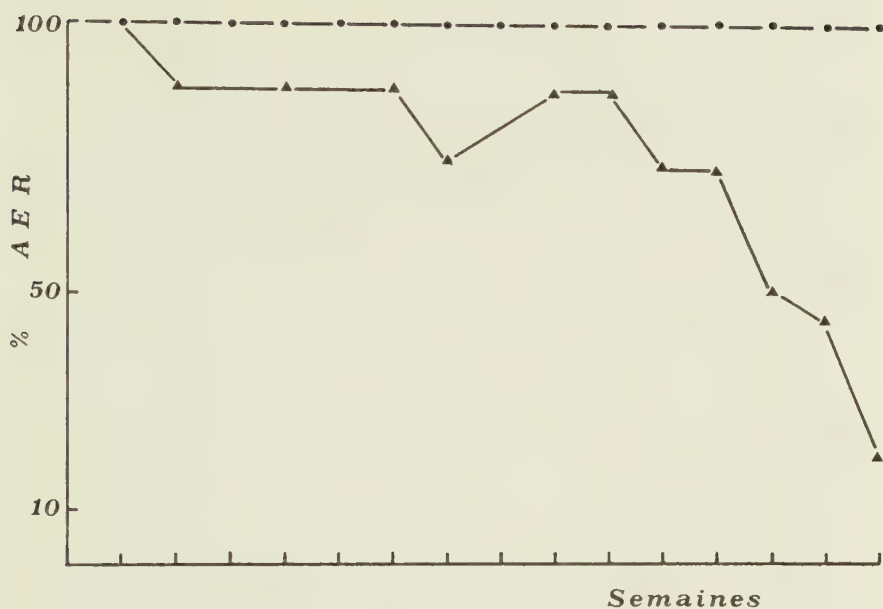


FIG. 50 VARIATION DE L'ACTIVITÉ DE LA α -GLUC-DH-Ti
EN FONCTION DU TEMPS SELON LE MODE DE CONSERVATION

IMER CONSERVÉ VIDE À -70°C

IMER CONSERVÉ VIDE À -18°C

DANS LES DEUX CAS 50 ÉCHANTILLONS DE SÉRUM
SONT ANALYSÉS UNE FOIS PAR SEMAINE,

L'ACTIVITÉ RELATIVE (AER) EST EXPRIMÉE EN % PAR
RAPPORT À L'AER INITIALE.

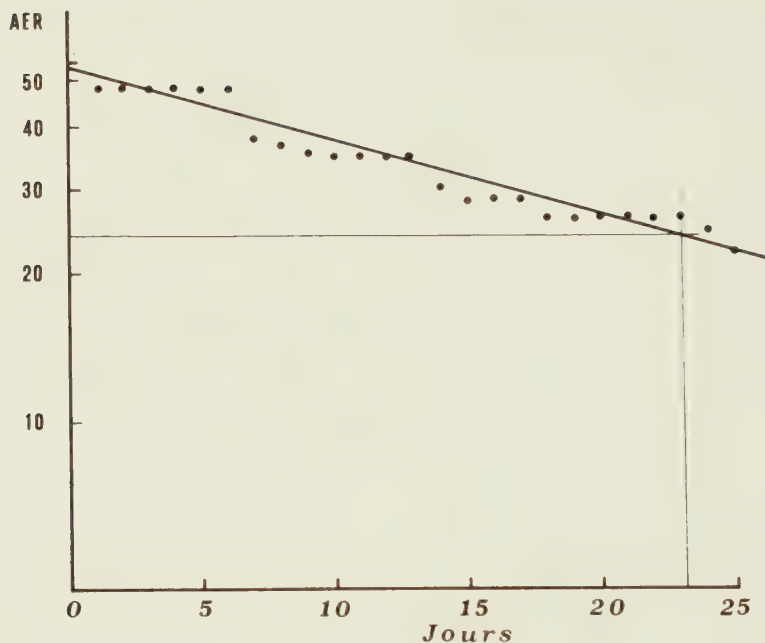


FIG. 51 DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ EN FONCTION DU TEMPS
POUR LA V-GLUC-DH-TI UTILISÉE DANS LA ROUTINE
POUR LA DÉTERMINATION DU GLUCOSE.

COURBE EXPÉRIMENTALE

COURBE THÉORIQUE DÉTERMINÉE D'APRÈS
LA MÉTHODE DE REGRESSION LINÉAIRE.

A = ACTIVITÉ EN UNITÉ ARBITRAIRE.

4. RESUME

De tous les systèmes enzymatiques, pour la détermination du glucose dans des liquides biologiques, la glucose déshydrogénase s'impose par sa simplicité. Son immobilisation à la surface intérieure des tubes de nylon a d'abord été réalisée par les méthodes classiques, puis améliorée au moyen de la fixation par complexation (titane).

Par l'intermédiaire des liaisons de titane, la tentative de fixer cette enzyme à la surface des serpentins de verre conduisait à des dérivés de haute activité enzymatique. Ceci formait la base pour une application analytique de bonne performance. Au cours de ce travail, les différentes enzymes immobilisées ont été soumises à un examen du comportement cinétique. Les résultats permettent de constater que par tous les modes de fixation l'on obtenait des enzymes immobilisées dont les paramètres cinétiques étaient semblables à ceux de l'enzyme native. Ceci confirme que notre technique d'immobilisation n'altère ni la structure, ni la fonction catalytique de l'enzyme. Les paramètres cinétiques déterminés ont permis d'établir les conditions nécessaires à l'application des enzymes immobilisées dans l'analyse automatique à flux continu : La détermination K_M' (constante de Michaelis apparente, $2 \cdot 10^{-2} M$) a fourni une information sur le domaine dans lequel une réaction de premier ordre en glucose était possible.

L'activité spécifique des différents réacteurs enzymatiques a été évaluée et les études cinétiques prouvaient qu'il était possible de mesurer essentiellement la vitesse initiale, ce qui garantissait la linéarité de la méthode analytique.

L'application analytique nous amène à confirmer que le système d'enzymes immobilisées sur verre au moyen du TiCl_4 donne les meilleurs résultats. Le domaine de linéarité s'étend de 0 à 55 mmol/l, le coefficient de variation par jour est inférieur à 0,015 et inférieur à 0,06 au cours de l'étude (trois semaines). Pour une fréquence d'analyse de 150 échantillons par heure (SMAC), le coefficient de contamination (selon Hjelm) est de 0,04. La corrélation avec une méthode de routine est bonne ($N = 508$, $r = 0,9949$). La méthode est donc praticable dans un laboratoire de routine (deux mois d'expérience). La fixation de la GOD et de l'uréase par la même méthode permet d'espérer une généralisation de la technique dans l'immobilisation d'autres enzymes.

5. SUMMARY

Of all the enzyme systems for the determination of glucose in biological material the glucose dehydrogenase is noteworthy because of its simplicity. It has been immobilized at the inner surface of nylon tubings by classical methods first, then the immobilization has been improved by the fixation through complexation (titanium). The tentatives of fixing the enzyme to the surface of glass coils by titanium bridges afforded a highly active enzyme suitable for analytical applications of good performance.

The different immobilized enzymes in this study have been tested for their kinetic behaviour. The results showed that the activity of the immobilized derivatives was sufficient and that all the different modes of fixation afforded immobilized enzymes with kinetic parameters similar to those of the native enzyme. This leads to the conclusion that the immobilization procedure did not strongly alter either the structure or the function of these enzymes. The kinetic parameters that were determined allowed to find the necessary conditions for the implementation of the coils in an analytical application :

The determination of K'_M (apparent constant of Michaelis, $2 \cdot 10^{-2} M$) gave us the information on the concentration to be used in order to obtain essentially a first order reaction with respect to glucose. The specific activity of the coils has been measured and the study of the kinetic behaviour showed that it is possible to measure initial rates of reaction to a good approximation which warrants the linearity of the analytical procedure.

A thorough examination of the analytical applications showed the glucose dehydrogenase immobilized on glass by titanium bridges to yield the best performance. The method is

linear from 0 to 55 mmol/l. The variation coefficient during one day is smaller than 0,015 and does not exceed 0,06 during the entire study (3 weeks). Carry-over as characterized by the factor of Hjelm is 0,04 for a frequency of 150 analyses per hour (SMAC). The correlation with a routine method is excellent ($N = 508$, $r = 0,9949$) and the practicability in a routine laboratory is shown to be good (2 months of experience). The immobilization of glucose oxydase and urease by the same procedure may well show that this method can be generally applied.

6. ABREVIATIONS

AAII	Autoanalyzer II (Autoanalyseur de deuxième génération, marque déposée)
AER	Activité enzymatique relative
ALAT	Alanine-transaminase
A _s	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
ASAT	Aspartate-transaminase
CE	Concentration du glucose (mmol/l), valeur expérimentale
CF	Concentration du glucose (mmol/l), valeur de référence
C _N (N = 1,2..)	Cuve optique
CV	Coefficient de variation
DMA	Diméthylaniline
E _a	Energie d'activation (KJ/mol)
E	Enzyme native
Gluc-DH	Glucose déshydrogénase
n-Gluc-DH-G	Glucose déshydrogénase immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire du glutaraldéhyde
n-Gluc-DH-Mo	Glucose déshydrogénase immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire des liaisons de molybdène
n-Gluc-DH-Ti	Glucose déshydrogénase immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire des liaisons de titane
n-Gluc-DH-V	Glucose déshydrogénase immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire des liaisons de vanadium
n-Gluc-DH-Zr	Glucose déshydrogénase immobilisée dans les tubes de nylon par l'intermédiaire des liaisons de zirconium

v-Gluc-DH-G	Glucose déshydrogénase immobilisée sur du verre par l'intermédiaire du glutaraldéhyde
v-Gluc-DH-Ti	Glucose déshydrogénase immobilisée sur du verre par l'intermédiaire des liaisons de titane
GLUTAL	Glutaraldéhyde
GOD	Glucose oxydase
v-GOD-Ti	Glucose oxydase immobilisée sur du verre par l'intermédiaire des liaisons de titane
Hexo	Méthode à l'hexokinase
K_M	Constante de Michaelis
K'_M	Constante de Michaelis apparente
MBTH	3-méthyl-2-benzothiazolinonehydrazone
MX_n	Sel de métaux de transition (X = Cl, n = 1,2..)
N	Nombre de dosages
NAD	Nicotinamide-adénine-dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (forme réduite)
N,N-DMPA	N,N-diméthyl-aminopropylamine
OTHER	Open Tubular Heterogenous Enzyme Reactor (réacteur d'enzyme à tube ouvert)
PJ	Précision pendant une journée
PJ10	Précision de jour en jour pendant dix jours
PJS1	Précision de jour en jour pendant la première semaine
PJS3	Précision de jour en jour pendant la troisième semaine
RE	Réacteur non activé

SI (I = 1,2..) Solution I

SMAC	Sequential multiple analysis with computer (marque déposée)
TAPI	Tampon d'immobilisation
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
$V_{\max}$	Vitesse maximum ($M \cdot \min^{-1}$)
$V'_{\max}$	Vitesse maximum apparente ($M \cdot \min^{-1}$)

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. RICHTERICH, Chimie Clinique théorique et pratique,
version française par A. Farine, Ed. Doin Paris (1967)
- 2 L. MICHAELIS, M. L. MENTEN, Biochem. Z., 49, 333 (1913)
- 3 J. B. SUMMER, J. Biol. Chem. 69, 435 (1926)
- 4 J. M. NELSON et E. G. GRIFFIN,
J. Amer. Soc. 38, 1109 (1916)
- 5 I. LANGMUIR et V. J. SCHAEFER,
J. Am. Chem. Soc. 60, 1351 (1938)
- 6 I. LANGMUIR et V. J. SCHAEFER, Chem. Rev. 24, 181 (1939)
- 7 H. C. ISLIKER, Adv. Protein Chem. 12, 387 (1957)
- 8 H. C. ISLIKER, Ann. N.Y. Acad. Sc. 57, 225 (1953)
- 9 G. MANECKE et K. E. GILBERT,
Naturwissenschaften, 42, 212 (1955)
- 10 N. GRUBHOFER et L. SCHLEITH,
Naturwissenschaften, 40, 508 (1953)
- 11 N. GRUBHOFER et al,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 297, 108 (1954)
- 12 A. D. McLAREN, J. Phys. Chem. 58, 129 (1954)
- 13 C. A. ZITTLE, Adv. Enzymol, 14, 319 (1953)
- 14 A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI,
Nature 188, 856 (London) (1960)
- 15 E. KATCHALSKI, dans "Polyamino Acids Polypeptides,
Proteines" (M. A. Stahmann, ed.),
p. 283, Uni. of Wisconsin Press, Madison (1962)
- 16 E. KATCHALSKI et al,
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 34, 445 (1971)

- 17 M. A. MITZ, L. Summaria. Nature, 189, 576 (1961)
- 18 R. AXEN et al, Nature (London) 214, 1302 (1967)
- 19 D. J. INMAN et H. M. DINTZIS,
Biochemistry 8, 4074 (1969)
- 20 H. H. WEETALL, Science 166, 615 (1969)
- 21 H. H. WEETALL, Biochem. Biophys. Acta 212, 1 (1970)
- 22 W. E. HORNBY et H. FILIPPUSON,
Biochem. Biophys. Acta 220, 343 (1970)
- 23 D. J. INMAN et W. E. HORNBY, Biochem. J. 129, 255 (1972)
- 24 L. GOLDSTEIN, A. FREEMAN et SOKOLOVSKY,
Biochem. J. 143, 497 (1974)
- 25 J. CAMPBELL, W. E. HORNBY et D. L. MORRIS,
Biochem. Biophys. Acta 384, 307 (1975)
- 26 E. BISSE et D. VONDERSCHMITT,
FEBS-Letters 81, 326 (1977)
- 27 E. KATCHALSKI, E. SILMAN et R. GOLDMAN Adv.,
Enzymol. 34, 445 (1971)
- 28 L. B. WINGARD, Jr. Adv. Biochem. Eng. 2, 1 (1971)
- 29 H. H. WEETALL, Anal. Chem. 46, 602 A (1974)
- 30 O. R. ZABORSKI,
"Immobilized Enzymes" C.R.C. Press, Cleveland Ohio (1973)
- 31 L. GOLDSTEIN et G. MANECKE,
Applied Biochemistry and Bioengineering (L. B. Wingard
Jr. ed.) Immobilized Enzyme Principles 1, 23 (1976)
- 32 "Protein-Metal Interactions" Mendel Friedman ed.
Plenum Press New York (1974)

- 33 EMERY, A. N., HOUGH, J. S., NOVAIS, J. M. et LYONS, T. P.,
The Chemical Engineer, pp. 71-76 (1972)
- 34 F. WOLD "Bifunctional reagents" Methods Enzymol. 11,
617 (1967)
- 35 R. AXEN et J. PORATH, Nature 210, 367 (1966)
- 36 E. M. CROOK, Biochem J. 107, 486 (1968)
- 37 GOLDMANN et al, Biochemistry 7, 486 (1968)
- 38 H. P. GREGOR et P. W. RAUF,
Biotechnol, Bioeng. 17, 445 (1975)
- 39 H. Robert HORTON et Harold E. SWAISGOOD,
dans "Methods in Enzymology" Vol XLIV, 516 Immobilized
Enzyme Ed. Klaus Mosbach N.Y. (1976)
- 40 T. TOSA, T. MORI et I. CHIBATA,
Agr. Biol. Chem. 33, 1053 (1969)
- 41 I. CHIBATA et al
dans "Fermentation Technology Today" (G. Terui, ed.)
Soc. Ferment. Technol., Japan, 383-391 (1972)
- 42 I. CHIBATA et T. TOSA
dans "Applied Biochemistry & Bioengineering" (Lemmel B.,
Wingard Jr. ed.), Immobilized Enzyme Principles, Vol. 1,
329-340 Academic Press N.Y. (1976)
- 43 I. CHIBATA, T. TOSA et T. SATO,
Appl. Microbiol. 27, 878 (1974)
- 44 I. CHIBATA, T. TOSA et MATSUO
dans "Enzyme Engineering" (E. K. Pye & L. B. Wingard eds.)
Vol. 2, 229, Plenum N.Y. (1974)
- 45 D. LILLY,
"Symposium sur les protéines chimiquement greffées et
réticulées", Rouen, 15 sept. (1972)
- 46 MD LILLY et A. K. SHARP,
The Chem. Eng. 215, CE 12 (1968)

- 47 H. MAEDA, H. SUZUKI et A. SAKIMAE,
Biotechnol. Bioeng. 15, 403 (1973)
- 48 H. H. WEETALL et N. B. HAVEWALA
dans "Enzyme Engineering" (L. B. Wingard, Jr. ed.)
Interscience, N.Y. (1972)
- 49 W. H. PITCHER, Jr. et H. H. WEETALL,
"Presented at the Amer. Chem. Soc. Chem. Engineering
Symposium", Purdue University, January (1974)
- 50 K. SMITEY et G. W. STRANDBERG,
Adv. Appli. Microbiol. 15, 13-38 (1972)
- 51 H. H. WEETALL, Food Prod. Dev. 1, 46 (1973)
- 52 J. C. DAVIS, Chem. Eng. Aug. 19, 52 (1974)
- 53 B. K. HAMILTON, C. K. COLTON et C. L. COONEY,
"Immobilized Enzymes & Microbial Processes",
(A. C. Olson and C. L. Cooney, ed.) 85, Plenum N.Y. (1974)
- 54 D. A. SELF, G. KAY, M. D. LILLY et P. DUNNILL,
Biotechnol. Bioeng. 11, 337 (1969)
- 55 M. D. LILLY et al,
Brit. Patent 1, 183 260 (1970)
- 56 M. D. LILLY et al.
"Fermentation Technology Today" (G. Teru ed.), p. 379
Soc. Ferment. Technol. Tokyo (1972)
- 57 Chem. Age Int. 108, (Jan. 4/11) p. 19 (1974)
- 58 Chem. Eng. News Feb. 4, p. 14 (1974)
- 59 C. H. HOFFMANN, E. HARRIS et al,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 710 (1970)
- 60 K. MOSBACH et P. LARSSON,
Biotechnol. Bioeng. 12, 19 (1970)
- 61 H. G. GASSEN,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1410 (1971)

- 62 L. K. FERRIER, T. RICHARDSON, N. F. OLSON et C. L. HICKS,
"Presented at 66th Annual Meeting American Dairy Sc. Assoc.
Michigan State University", June 1971
- 63 W. F. LINE, A. KWONG et H. H. WEETALL,
Biochem. Biophys. Acta 242, 194 (1971)
- 64 F. MORISI, M. PASTORE et A. VIGLIA,
J. Dairy Sc. 56, 1123 (1973)
- 65 G. O. HUSTED, T. RICHARDSON et N. F. OLSON,
J. Dairy Sc. 56, 118 (1973)
- 66 J. H. WOYCHIK et M. V. WONDOLOWSKI,
J. Milk Food Technol. 36, 31 (1973)
- 67 A. DAHLQUIST, B. MATTIASSON et K. MOSBACH,
Biotechnol. Bioeng. 15, 395 (1973)
- 68 M. CHARLES, R. W. COUGHLIN et al,
"Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatogr."
(B. R. Dunlap ed.) p. 213, Plenum N.Y. (1974)
- 69 H. H. WEETALL, N. B. HAVEWALA et al,
Biotechnol. Bioeng. 16, 295 (1974)
- 70 F. X. HASSELBERGER, B. ALLEN, E. K. PARUCHURI, M. CHARLES
et R. W. COUGHLIN,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1054 (1974)
- 71 H. H. WEETALL,
"Immobilized Enzymes for Industrial Reactors" (Ralph A.
Messing ed.) p. 202-204, Academic Press N.Y. 1975
- 72 THOMAS MING SWI CHANG, Science Tools 16, No 3, 33 (1969)
- 73 H. ISRAEL SILMAN et E. KATCHALSKI,
Ann. Review of Biochem. 35, Pt. 2, 873 (1966)
- 74 T. M. S. CHANG,
"Artificial Cells", Charles C. Thomas, Springfield,
Illinois (1972)
- 75 D. SAMPSON, T. HAN, L. S. HERS, G. P. MURPHY,
J. Surg. Oncol 6, 39 (1974)

- 76 Transactions ASAI0, 17, 341 Washington (1971)
- 77 T. M. S. CHANG dans "Immobilized Enzymes and Proteins",
1, 93 (T. M. S. Chang, ed.) Plenum N.Y. (1977)
- 78 M. K. WEIBEL, W. DRITSCHILO, H. J. BRIGHT et A. E. HUMPHRY,
Anal. Biochem. 52, 402 (1973)
- 79 JUI-CHANG W. KUAN, SHIA S. KUAN et G. GEORGE,
Clin. Chem. 23, (6), 1058 (1977)
- 80 N. B. HAVEWALA et H. H. WEETALL,
U. S. Patent 3, 767, 535 (1973)
- 81 G. P. HICKS et S. J. UPDIKE,
Anal. Chem. 38, 726 (1966)
- 82 S. J. UPDIKE et G. P. HICKS, Science 158, 170 (1967)
- 83 GUILBAULT, "Enzymatic Engineering",
(L. B. Wingard Jr., ed.) Interscience N.Y. (1972)
- 84 G. G. GUILBAULT et J. G. MONTALVO,
J. Amer. Chem. Soc. 91, 2164 (1969)
- 85 G. G. GUILBAULT,
"Enzymatic Methods of Analysis", Pergamon Press N.Y. (1970)
- 86 L. CLARK, Jr.
"Enzyme Engineering" (L. B. Wingard, Jr., ed)
Interscience N.Y. (1972)
- 87 RIVITTO, B. J. et J. R. KITTREL,
Biotech. Bioeng. 15, 143 (1973)
- 88 GUILBAULT et G. J. LUBRANO, Anal. Chem. Acta 60, 254 (1972)
- 89 GUILBAULT et G. J. LUBRANO, Anal. Chem. Acta 64, 439 (1973)
- 90 R. A. MESSING, Biotechnol. Bioeng. 16, 525 (1974)
- 91 A. JOHANSSON, J. LUNDBERG, B. MATTIASSON, K. MOSBACH,
Biochem. Biophys. Acta 304, 217 (1973)

- 92 AL. CHANEY dans Technicon Symposia, 1967,
(NB Scova. N.Y. Ed.) Mediad, 1, 115 (1968)
- 93 W.J. SMYTHE, M.H. SHMOS, S. MORGENSTERN et al
dans "Technicon Symposia" 1966 (NB Scova. N.Y. Ed.),
Mediad, 1, 105 (1967)
- 94 Fundamental of Clinical Chemistry, p. 108-115,
Ed. Norbert W. Titz London (1970)
- 95 L. R. SNYDER, J. Chromatogr. 125, 287-306 (1976)
- 96 "Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides"
Vol. 1 ed. Horward, H. Weetall N.Y. (1975)
- 97 LEON, GOLDSTEIN et MANECKE
dans "Applied Biochem. and Bioeng. Immobilized Enzyme
Principles" Vol. 1, 104-110 ed. Lemuel B. Wingard,
Jr. Academic Press New York (1976)
- 98 HJELM, M. Anal. Chem. 243, 781-790 (1968)
- 99 A. SCHOLER et A. PIANEZZI,
J. Clin. Chem. Biochem. 14, 189-195 (1976)
- 100 N. GOCHMAN et SCHMITZ, J. M. Clin. Chem. 18, 943 (1972)
- 101 SMAC Operator's Daily Energy Log Technicon Instruments
Corporation New York (1975)
- 102 Analysis of progress Curves. "Principales of Enzyme Kinetics"
Cornish - Bowden Butterworths London (1976)
- 103 Recommendations for Standardization of Nomenclature in
enzyme technology Biotechnol. and Bioeng. Symp. No 3,
15-18 (1972) ed. John Wiley and Sons, Inc. (1972)
- 104 Hans E. PAULY et Gerhard PFLEIDERER
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 1613-1623 (1975)
- 105 Kontakte 2/76 MERCK, Darmstadt
- 106 LEON, L. P. NARAYANAN, R. DELLENBACH et C. HORVATH,
Immobilized Glucose Oxidase used in the Continuous-flow
Determination of Serum Glucose,
Clin. Chem. 22/7, 1017-1023 (1976)

- 107 H. H. WEETALL, L. S. HERSH,
Biochim. Biophys. Acta, 206, 54-60 (1970)
- 108 L. GOLDSTEIN
Microenvironmental Effects on Enzyme Catalysis. A. Kinetic
Study of Polyanionic and Polycationic Derivatives of
Chymotrypsin.
Biochemistry 11/22, 4072-4084 (1972)
- 109 L. GOLDSTEIN et al, Biochemistry 3, 1913 (1964)
- 110 C. W. WHARTON, E. M. CROOK et K. BROCKLEHURST,
European J. Biochem. 6, 572-578 (1968)
- 111 R. FELD et P. L. COWE,
The Organic Chemistry of Titanium Butterworth, London (1965)
- 112 Dr. WYBENGA, J. Di GIORGIO, Vj. PILEGGI,
Clin. Chem. 17, 891 (1971)
- 113 L. P. LEON, M. SANSUR et C. HORVATH,
Continuous-Flow Analysis for Glucose, Triglycerides and
ATP with Immobilized Enzymes in Tubular Form,
Clin. Chem. 23/9, 1556-1562 (1977)
- 114 N. B. HAVEWALA et W. H. PITCHER, Jr.
Immobilized Glucose Isomerase for the Production of
High Fructose Syrups,
Enzyme Engineering II, ed. E. K. Pye et L. B. Wingard,
Plenum Press (1974)

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été effectué (1976 - 1979) dans les laboratoires de chimie clinique de l'hôpital universitaire de Bâle, sous la direction de Monsieur le professeur D.J. Vonderschmitt.

C'est avec plaisir que nous exprimons notre reconnaissance à M. le professeur D.J. Vonderschmitt qui a su choisir le sujet, puis a permis et encouragé la réalisation de cette thèse.

Nous désirons également remercier M. le professeur Métais de Strasbourg et M. le professeur Stutz pour avoir accepté de faire partie du jury.

Nous remercions particulièrement Mlle Nicole Golay pour sa contribution à la correction du texte français et son soutien.

Nos remerciements s'adressent:

à André Scholer qui nous a fait profiter de son expérience dans l'analyse à flux continu,
à Tran-Hu-Tri pour ses suggestions et critiques constructives,
au personnel du laboratoire de chimie clinique de l'hôpital cantonal de Bâle et à Mlle H. Righetti pour son travail dactylographique.

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont permis de poursuivre les études en Suisse et qui seraient trop nombreux pour êtres cités ici.

Parmi eux, que le R.P. Omer Bauer, la famille Oetterli, le Dr. De Haller, la Confédération helvétique (octroi d'une bourse), M. le professeur K. Bernauer, trouvent ici l'expression de notre gratitude.

